

THESES

présentées à

**LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS**

pour l'obtention du titre

de DOCTEUR de l'UNIVERSITE de PARIS
(mention Sciences)

par

MARCEL BORGERS

1re Thèse

Le développement des anastomoses interartérielles dans le cœur du chien.
Etude morphologique et cytochimique.

2me Thèse

L'effet des rayons-X sur la muqueuse de l'intestin grêle et du gros intestin de la souris.

Soutenues le 28 juin 1971 devant la Commission composée de

MM. R. COUTEAUX Président
B. DROZ
P.Y. HATT Examineurs

THESES

présentées à

**LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS**

pour l'obtention du titre

de DOCTEUR de l'UNIVERSITE de PARIS
(mention Sciences)

par

MARCEL BORGERS

1re Thèse

Le développement des anastomoses interartérielles dans le cœur du chien.
Etude morphologique et cytochimique.

2me Thèse

L'effet des rayons-X sur la muqueuse de l'intestin grêle et du gros intestin de la souris.

Soutenues le 28 juin 1971 devant la Commission composée de

MM. R. COUTEAUX Président

B. DROZ

P.Y. HATT

Examineurs



Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude à Monsieur R. COUTEAUX, Professeur de la Faculté des Sciences de Paris, qui nous a accueilli avec beaucoup de bienveillance et qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Que de Docteur P. JANSSEN, Directeur des laboratoires de Recherches "Janssen Pharmaceutica", auquel nous devons d'avoir pu réaliser ce travail, trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Qu'il nous soit permis d'exprimer toute notre gratitude au Docteur W. SCHAPER, Chef du Département Cardiovasculaire, à qui nous devons le sujet de la thèse et qui, par ses encouragements et conseils, a inspiré et guidé cette recherche.

Nous prions également Messieurs les Professeurs B. DROZ et P. Y. HATT, qui ont bien voulu accepter de participer au jury, de croire à notre respectueuse reconnaissance.

Il nous est particulièrement agréable de remercier le Docteur J. SCHAPER qui a grandement contribué à la réalisation de cette étude et qui nous a fait bénéficier de ses conseils précieux et de son soutien amical tout le long de notre travail.

Nous avons eu la chance de travailler sous la direction du Docteur J. HUGON, Professeur agrégé de la Faculté de Médecine de Sherbrooke. C'est lui qui nous a initié à la recherche expérimentale et qui nous a guidé pendant de longues années. Nous sommes particulièrement reconnaissants pour les marques de confiance qu'il nous a témoignées en se chargeant de notre introduction à la Faculté des Sciences de Paris.

Nos vifs remerciements vont également à Monsieur R. XHONNEUX pour sa collaboration amicale et ses conseils éclairés lors de la préparation du manuscrit.

La collaboration de Messieurs F. THONE, P. VAN EVEN et L. LEYSSEN a été particulièrement appréciée, tandis que Mme. M. BRUYLANDTS et Mlle. M. VAN ELST ont assuré avec compétence la dactylographie du manuscrit. Nous leur adressons à tous, nos sincères remerciements.

TABLE DES MATIERES

1 re partie : La morphologie du développement des vaisseaux collatéraux coronaires chez le chien.

Introduction	p. 1
Préparation des tissus vasculaires destinés à l'étude morphologique	p. 3
Généralités	p. 5
Chapitre 1. Les artérioles anastomosées chez les animaux contrôls	p. 6
Chapitre 2. Le développement des jonctions collatérales au stade de 3 semaines après opération	p. 8
Chapitre 3. Interprétation des événements se déroulant pendant la phase précoce du développement	p. 11
Chapitre 4. La phase proliférative 8 - 12 semaines après implantation	p. 14
Chapitre 5. Signification des observations à 8 - 12 semaines post-opératoires	p. 19
Chapitre 6. Les stades tardifs du développement 1 - 2 ans après opération	p. 22
Chapitre 7. Interprétation des résultats obtenus lors de l'étude des stades avancés	p. 24

2 me partie : La cytochimie des hydrolases phosphatasiques dans les vaisseaux coronaires normaux, et dans les vaisseaux anastomosés à différents stades de développement.

Introduction	p. 26
Chapitre 1. La méthodologie cytochimique	
1. Préparation de tissu vasculaire et myocardique pour les besoins de la cytochimie enzymatique	p. 28
2. Milieux d'incubation	p. 29
3. Les expériences témoins	p. 30
4. Critique de la méthodologie	p. 31

Chapitre 2. La distribution des phosphatases dans les vaisseaux coronaires et le muscle myocardique chez le chien normal	
1. Les artères et les artérioles coronaires	p. 33
2. Les artérioles terminales et les capillaires	p. 36
3. Le système veineux	p. 37
4. Le muscle myocardique	p. 37
Chapitre 3. Les expériences de contrôle	p. 39
Chapitre 4. Les rôles physiologiques des hydrolases phosphatasiques	p. 40
Chapitre 5. La distribution des phosphatases dans les vaisseaux anastomosés à différents stades de développement	
1. L'adénosine tri- et diphosphatases	p. 46
2. La thiamine pyrophosphatase	p. 49
3. La phosphatase alcaline	p. 51
4. La phosphatase acide	p. 51
5. La 5'-nucléotidase	p. 54
6. La glucose-6-phosphatase	p. 55
Résumé	p. 57
Bibliographie	p. 62
Iconographie	p. 78

Ire Partie : La morphologie du développement des vaisseaux collatéraux coronaires chez le chien.

Introduction

L'ischémie cardiaque causée par la sténose du système artériel coronaire ne peut être traitée que par stimulation d'un mécanisme de défense naturel situé dans le cœur même : le système circulatoire par voie collatérale. Tout traitement de l'ischémie cardiaque est lié à l'habilité de développer ce précieux système (Schaper 1967 a).

La sténose artérielle qui en pathologie humaine résulte de l'athérosclérose, est imitée expérimentalement chez le chien au moyen d'un constricteur améroidé placé autour de la branche circonflexe de l'artère coronaire gauche. Après cette implantation, une constriction lente et progressive s'installe amenant une occlusion complète après environ deux semaines et demi.

Suite à l'occlusion, environ 37 % des animaux traités meurent dans un délai de 2 semaines après opération ; 60 % développent un infarctus myocardique et 40 % des chiens survivent le traitement sans infarctus myocardique (Schaper 1971). Ces animaux ont été capables de rétablir une circulation par voie collatérale suffisante pour remplacer l'artère sténosée.

Ces vaisseaux collatéraux, en nombre variable chez chaque animal, sont très bien visibles macroscopiquement grâce à leur position épicaudique.

Ils se sont développés à partir des anastomoses artériolaires préexistantes ; ceci a été clairement démontré par des expériences physiologiques et en particulier par les mesures d'augmentation du débit collatéral, et de la pression coronaire périphérique (Linder 1966, Schaper 1967 a).

D'autre part, les observations faites en microscopie optique (Schaper 1967 a) ont mis en évidence des modifications morphologiques importantes qui transforment les jonctions artériolaires de dimension d'environ 40 - 80 microns en artères fonctionnelles qui vont jusqu'à 1500 microns.

La microscopie optique a également montré que ces modifications ne sont pas uniformément distribuées tout le long du vaisseau collatéral.

De nombreux travaux morphologiques ont été consacrés à l'étude des différentes couches de la paroi vasculaire chez divers animaux et chez l'homme

(Pease and Paul 1960, Buck 1958, Pease and Molinari 1960, Rhodin 1962).

En ce qui concerne les vaisseaux du cœur, les grandes artères coronaires ont été bien décrites en microscopie optique et électronique (Ahmed 1968). Par contre, le système artériolaire qui nous intéresse en particulier, est moins intensément étudié.

La morphologie des jonctions inter-artériolaires, trouvées en quantité variable dans le cœur des chiens normaux, et leur développement sous influence d'hypoxie myocardique, est un domaine qui ne paraît pas avoir encore été abordé par la microscopie électronique.

L'objectif de notre recherche fut de déterminer au niveau ultrastructural, les modifications morphologiques qui ont lieu dans la paroi des vaisseaux anastomosés et ceci aux différents stades de développement (la croissance a été suivie jusqu'à 2 ans après l'initiation de l'occlusion de l'artère circonflexe) et dans les différents segments du vaisseau : c. -à-d. le segment de départ sommé souche ("stem"), les segments médians ("midzone") et le segment terminal ("reentrance") par analogie avec la nomenclature de Longland (1953) (cfr figure 1).

Préparation des tissus vasculaires destinés à l'étude morphologique.

L'expérience a porté sur 20 chiens, mâles et femelles, d'un poids moyen de 15 kg. Un groupe de 3 chiens a servi de contrôle. Les autres chiens ont subi une thoracotomie pendant laquelle un constricteur améroïde a été implanté autour de l'artère coronaire circonflexe gauche (fig. 1). Ce constricteur améroïde employé pour la première fois par Berman en 1956, et ensuite appliqué aux artères coronaires par Litvak, Siderides et Vineberg en 1957 et par Schaper en 1966, se compose d'un matériel plastique hygroscopique à base de caséine, inclus dans un anneau en acier inoxydable.

Sous l'influence de l'humidité environnante, la lumière de l'artère coronaire est lentement occludée jusqu'à constriction complète.

Des expériences "in vitro" ont prouvé que l'occlusion complète est atteinte après un séjour de $\pm$ 18 jours dans une solution saline ayant la même tonicité que le milieu entourant l'artère en question.

Le diamètre inférieur original de l'améroïde est variable et est adapté au calibre correspondant de l'artère coronaire circonflexe qui varie d'un animal à l'autre.

Les animaux sont utilisés à différents moments après implantation : un groupe de 5 chiens après 3 semaines ; un groupe de 5 chiens après 8 semaines ; un groupe de 2 chiens après 12 semaines ; un groupe de 3 chiens après un an et finalement un groupe de 2 chiens après 2 ans.

L'anesthésie des chiens est obtenue par injection successive de morphine (2, 5 mg/kg s. c.) et de Nembutal ($\pm$ 15 mg/kg i. v.) à une heure d'intervalle. Le thorax est ouvert sous respiration artificielle. Une canule est insérée dans la crosse aortique via l'artère carotide ; l'aorte descendante et le tronc brachiocephalique sont ligaturés. L'appendice de l'oreillette droite est coupé pour permettre l'exsanguination et la sortie des solutions de perfusion.

Différentes solutions fixatives ont été essayées ; parmi elles le glutaraldéhyde, fraîchement distillé selon le procédé de Fahimi et Drochmans (1965), en concentration peu hypertonique, ou le formaldéhyde, préparé à partir de paraformaldéhyde, nous ont donné les meilleurs résultats en ce qui concerne la préservation des ultrastructures.

Une solution de tyrode, bien oxygénée, est perfusée sous une pression de 100 mm Hg jusqu'au moment où la plupart du sang est éliminé. Ce rinçage qui ne

prend pas plus que deux minutes, est immédiatement suivi par une perfusion d'une solution de glutaraldéhyde à 2 %, tamponné à pH 7.4 avec du cacodylate de sodium 0.1 M, ou d'une solution de formaldéhyde à 4 %, tamponné à pH 7.4 avec le tampon de Sørensen. Une bonne fixation est obtenue après une perfusion de 5 minutes.

Les cœurs sont rapidement enlevés du thorax et mis dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % tamponné au cacodylate.

Il est très facile d'identifier macroscopiquement les anastomoses qui connectent l'artère antérieure descendante avec l'artère circonflexe gauche.

Les vaisseaux collatéraux sont rapidement découpés, divisés en petits segments, numérotés de la souche jusqu'à l'entrée et soumis à une fixation complémentaire de 2 heures dans le même fixateur. Les segments sont lavés pendant la nuit dans le tampon cacodylate, additionné de 0.22 M sucrose. Ensuite, ils sont soumis à l' OsO_4 , 1,5 % tamponné au véronal-acétate de Michaélis pendant 1 heure, contrastés en bloc par l'acétate d'uranyle à 0,5 % à pH 5.2, deshydratés à l'éthanol et enrobés dans l'époue selon la méthode de Luft (1961).

Les coupes ultrafines, obtenues sur ultratome III LKB, sont colorées à l'acétate d'uranyle (Watson 1958) et au citrate de plomb (Reynolds 1963) ; elles sont examinées avec un microscope électronique Hitachi HS-8-I.

Les coupes semi-fines (1 micron), provenant des blocs inclus dans l'époue, servent pour la localisation topographique exacte des modifications dans les différents segments. Ces coupes sont colorées au Paragon 1301 (Spurlock et al. 1966) ou au Tri-chrome (Sevier et Munger 1968).

Généralités

De tous les animaux témoins et traités, un nombre variable de 5 à 9 vaisseaux anastomosés ont été examinés. Chaque vaisseau a été divisé en 4 ou 5 segments dont le premier et le dernier sont considérés respectivement comme segments de souche ("stem") et segment terminal ("reentry"), les deux ou trois pièces du milieu comme segments medians ("midzone") selon la classification de Longland. La figure 1 illustre la distribution classique des artères collatérales épicardiques du ventricule gauche.

Chapitre 1. Les artérioles anastomosées chez les animaux contrôle.

Le rayon luminal et l'épaisseur de la paroi des jonctions collatérales pré-existantes varient d'un vaisseau à l'autre. Les estimations faites en microscopie optique donnent les moyennes suivantes : les segments de souche : 500 microns et 8 couches de muscle lisse ; les segments médians montrent une diminution graduelle du rayon jusqu'à 35 microns et 1 - 2 couches de muscle lisse ; dans le segment terminal le rayon et l'épaisseur de la paroi augmentent de nouveau jusqu'à environ 500 microns.

La morphologie ultrastructurale des artérioles anastomosées (fig. 2) ne diffère guère de celle des artérioles non-anastomosées trouvées dans un même réseau sanguin, ou d'autres artères coronaires décrites dans la littérature. En bref, la paroi vasculaire comprend trois couches. D'abord l'intima qui est constituée d'une couche simple de cellules endothéliales linéairement rangées, reposant sur une membrane basale qui elle-même s'appuie sur une lamelle élastique discontinue (fig. 3). Les cellules endothéliales apparaissent très étirées, légèrement bombées à l'endroit où se trouve leur noyau. Cette forme aplatie est probablement due à la perfusion sous 100 mmHg et est peut-être la réplique de l'image que donnerait in vivo un vaisseau dilaté.

L'épaisseur de la lamelle élastique change proportionnellement avec l'épaisseur de la paroi. Etant la plus mince au niveau des segments médians, elle est fréquemment trouvée interrompue permettant ainsi un contact intime entre certaines parties de la cellule endothéliale et de la cellule musculaire lisse.

Le rôle fonctionnel de ces jonctions endothélio-musculaires n'est pas encore élucidé mais elles suggèrent fortement une participation dans le transport de métabolites sanguins vers la musculature. Ces métabolites sont probablement des cations jouant un rôle dans l'excitation-relaxation du muscle.

La membrane cellulaire, le noyau et les composants cytoplasmiques ont les mêmes caractéristiques ultrastructurales, telles que décrites pour les vaisseaux coronaires d'autres espèces (Ahmed 1968).

Néanmoins, le système vésiculo-tubulaire dans le cytoplasme endothélial comme décrit par Weibel et Palade (1967) et par Fuchs et Weibel (1966) n'est que rarement rencontré chez le chien.

D'autre part, deux types d'inclusions ont été observés.

D'abord sont apparues peu fréquemment des structures cristalloïdes en "nid d'abeille" situées librement dans le cytoplasme, non entourées de membrane.

Des particules similaires ont été observées par Blinzinger et al. (1968) et ils les ont décrites comme particules d'origine virale.

Le deuxième type d'inclusion plus fréquemment retrouvé est celui des fibres collagènes absorbées dans les profils de réticulum endoplasmique.

Nous n'avons pas pu déterminer s'il s'agissait d'un phénomène d'absorption fortuit ou actif. Un tel phénomène a été décrit par Graf et al. (1970) comme étant une propriété de la lignée fibroblastique.

La média est composée d'un nombre variable de cellules musculaires du type lisse, bien rangées très proches les unes des autres, entourées séparément par une membrane basale et très souvent de fibres collagènes (fig. 4).

Le détail ultrastructural de la cellule musculaire lisse est comparable à celui décrit par Majno et al. (1969). En addition, nous avons noté l'existence, dans certaines des cellules musculaires, de corps résiduels, parfois très complexes, contenant du matériel lipidique et du lipofuchsine (très souvent rencontré dans les cellules du muscle cardiaque).

La tunique adventitielle est composée de cellules du type mésenchymal (fibroblastes, fibrocytes et de rares macrophages) entourées de masses de collagène et de quelques amas de matériel élastique (fig. 5).

Des cellules nerveuses sont présentes à chaque niveau de l'adventice. Des contacts intimes entre les terminaisons nerveuses et les cellules musculaires lisses, comme décrits par Robinson (1969) dans le vas deferens du cobaye, n'ont jamais été trouvés dans les artérioles de ce calibre.

Chapitre 2. Le développement des jonctions collatérales au stade de 3 semaines après opération

Les modifications à ce stade précoce, c.-à-d., quelques jours après l'occlusion complète de l'artère circonflexe gauche peuvent se résumer en deux mots : "lésion" et "réparation".

Bien que la distribution des altérations morphologiques soit très semblable dans chaque vaisseau, l'intensité de la lésion est très variable.

Cette divergence dépend probablement du calibre initial des vaisseaux collatéraux ou du nombre des jonctions artériolaires préexistantes.

Nous pensons que les lésions les plus sévères seront retrouvées dans les cœurs qui ne possèdent qu'un nombre limité d'anastomoses, ou ceux qui n'ont que des jonctions collatérales de très faible diamètre.

En général, les lésions de ce genre se situent à l'endroit où la paroi vasculaire est la plus mince, donc à un endroit bien déterminé de la zone médiane. Une description des altérations dans les différents segments nous a paru le plus illustratif pour montrer la nature focale de la lésion et l'involution des zones voisines. Pour faciliter les descriptions ultérieures, nous avons numéroté ces segments de 1 à 5, du segment de souche jusqu'au segment terminal. Dans le segment de souche (1) et dans le segment terminal (5), nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence des changements quelconques des structures nucléaires ou cytoplasmiques, et ceci dans toutes les couches de la paroi vasculaire.

Les altérations trouvées dans les parties 2 et 3 sont en général très comparables, néanmoins plus fréquemment rencontrées dans le segment 3 (Borgers et al. 1970). L'apparence générale des cellules endothéliales peut être considérée comme normale. La rangée cellulaire reste aplatie et sans interruption. La membrane basale est bien conservée. La plupart des cellules montrent une activité métabolique augmentée, ceci est mis en évidence par l'augmentation de leur contenu en organites cytoplasmiques.

Les profils réticulaires et les ribosomes libres sont présents en abondance. L'appareil de Golgi, très étendu, est entouré par de nombreuses vésicules et tubules du type lisse. Certaines cellules paraissent agrandies.

Occasionnellement, des leucocytes ont été trouvés interposés entre deux cellules endothéliales, ou coincés entre la couche endothéliale et la lamelle élastique. La lamelle élastique elle-même, ne semble pas altérée dans ces seg-

ments. Le phénomène d'activité métabolique augmentée est également montré par les cellules musculaires de la média. Les myofilaments ont tendance à disparaître du centre de la cellule. Leur place est occupée par un nombre important de profils allongés, du type réticulum endoplasmique rugueux, un appareil de Golgi très dilaté, de nombreuses vésicules et vacuoles, entourés d'une membrane simple.

D'autre part, des modifications dégénératives sont observées dans les cellules musculaires lisses. Comme effets dégénératifs précoces, nous avons noté : la dilatation du réticulum endoplasmique (fig. 6), les mitochondries à matrice dilatée et l'augmentation du nombre de corps denses hétérogènes. Parmi les altérations plus sévères, citons la désorganisation nucléolaire, la désintégration nucléaire, la présence de corps lipidiques, la formation de cytolysomes très complexes et même la nécrose cellulaire totale (fig. 7).

Des leucocytes et des cellules mésenchymales du type fibroblastique sont fréquemment observés dans la partie distale de la média. Comme établi en microscopie optique ces dernières lésions ont un caractère focal et n'occupent pas plus d'un tiers de la surface de la média au niveau du segment 2 et la moitié au niveau du segment 3. Les autres parties paraissent complètement indemnes de changements morphologiques.

Des divisions mitotiques des cellules dans la média, telles que décrites par Schaper (1967 a) n'ont jamais été observées.

L'apparence de l'adventice a complètement changé : le nombre des fibroblastes actifs est considérablement augmenté. Parmi eux certains sont en mitose. L'immigration des leucocytes, surtout du type polymorphonucléaire, dans les parties plus distales de l'adventice, est très courante.

Le segment 4 est l'endroit qui a généralement le plus souffert du "stress" hémodynamique. La zone endommagée ne se présente pas en plaque comme c'était le cas dans le segment précédent, mais est concentrique cette fois-ci et occupe toute l'épaisseur de la paroi. La couche endothéliale très bombée est composée de cellules élargies, parfois multilobulées et contenant beaucoup d'organites cytoplasmiques. Leur membrane basale est très épaisse. Le matériel élastique se retrouve encore à certains endroits.

La média ne présente que de rares cellules musculaires normales, la plupart des cellules se trouvent dans un état nécrotique avancé (fig. 8).

Dans certains foyers, la ligne endothéliale est rompue et des aggrégats de thrombocytes et de globules rouges sont fréquemment notés près de ces ruptures.

Les membranes basales et élastiques ne sont plus retrouvées à ces endroits. La média de cette zone rupturée, est devenue très oedematique et ne contient que des cellules sanguines, quelques cellules musculaires très vacuolisées et des fragments nécrotiques, probablement de la même origine. Il est souvent difficile d'apprécier la limite entre la média et l'adventice. Les substances collagènes et élastiques, normalement présentes en abondance dans l'adventice, semblent dissoutes. Les macrophages et les globules blancs sont prédominants dans l'adventice. Les cellules mésenchymales sont souvent en état nécrotique (fig. 9)

Dans les zones très altérées, les cellules du tissu conjonctif n'ont pas montré d'activité mitotique.

Chapitre 3. Interprétation des événements se déroulant pendant la phase précoce du développement.

Les transformations morphologiques de la paroi vasculaire peuvent se résumer comme suit :

1. Une grande variété d'altérations allant de modifications légères jusqu'à la nécrose cellulaire complète, est observée.
2. Il est possible de classifier ces altérations topographiquement. Le degré de la lésion varie surtout avec la dimension du vaisseau ; les dommages étant les plus sévères aux endroits où le diamètre luminal original est très petit et là où la paroi musculaire est constituée de deux couches cellulaires seulement.
3. Des ruptures à certains endroits de la paroi vasculaire dans les zones les plus altérées ont comme conséquence l'invasion massive de cellules sanguines et de protéines plasmatiques.
4. Des signes caractéristiques de réparation ont été observés, tels que l'immigration de leucocytes du côté conjonctif et l'activité mitotique dans les segments 2 et 3.

Il nous paraît très vraisemblable que ces changements morphologiques sont causés par des événements hémodynamiques. L'hypoxie myocardique, provoquée par la sténose progressive et finalement l'occlusion complète d'une artère coronaire majeure, a causé la dilatation des vaisseaux de résistance situés dans la zone dépourvue de sang.

Il est bien évident qu'une extrême dilatation des vaisseaux de dimension artériolaire signifie que ces vaisseaux subissent un "stress" considérable. Schaper (1967 b) et Hoff et Gottlob (1967) associent la lésion vasculaire à l'augmentation de la tension tangentielle de la paroi.

Le fait que les phénomènes dégénératifs sont localisés préférentiellement dans les segments à dimension faible concorde avec cette conception.

La tension tangentielle de la paroi, déterminée par l'équation de Franck-Laplace, est proportionnelle au produit de la pression intravasculaire et du rayon luminal et inversement proportionnelle à l'épaisseur de la paroi vasculaire.

L'activité métabolique élevée au niveau des segments 2 et 3 peut être interprétée comme l'amorce d'une réaction de défense contre cette tension tangentielle augmentée.

D'autre part, un nombre de cellules musculaires hyperactives, particulièrement abondantes dans le segment 2 et caractérisées par l'abondance de réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi volumineux, le déplacement latéral des myofibrilles fait penser aux cellules musculaires modifiées décrites par Wissler (1968).

Selon Hoff et Gottlob (1968) elles peuvent représenter des cellules inactives à l'état normal se modifiant en cellules prolifératives. Les mêmes changements ont été observés par Esterly (1968) dans les phases précoces d'hypertension pulmonaire expérimentale. La capacité de défense de ces cellules semble cependant être limitée, puisque dans pratiquement toutes les jonctions collatérales, nous avons retrouvé des phénomènes de dégénérescence. Des phénomènes semblables ont été décrits par Hatt et Dontcheff (1959) et par Hatt et al. (1962 ; 1963) dans l'étude du mécanisme de l'hypertension artérielle expérimentale d'origine rénale chez le rat et le lapin, et par Liebow (1967) après hypertension des artères pulmonaires. Des espaces intercellulaires, dans la bordure endothéliale des zones altérées, suggèrent que la perméabilité pour des éléments du sang comme les protéines plasmatiques, est considérablement augmentée.

La diapédèse de leucocytes est une réaction très commune envers différents types d'altérations provoquées par des moyens physiques ou chimiques (Cotran et Remensnijder 1968, Robertson et al. 1959, Stehbens 1965, T'sao et Spaet 1967).

Une voie d'entrée du côté adventice est suggérée par l'abondance de leucocytes dans la tunique conjonctive du vaisseau collatéral et la localisation intramurale de leucocytes dans la paroi des veines et veinules situées dans la partie distale de l'adventice.

La perméabilité augmentée des veines et veinules environnantes est certainement causée par l'inflammation périvasculaire de l'artère collatérale endommagée.

Que les leucocytes pénètrent la paroi par les discontinuités endothéliales (les espaces entre les cellules ou les ruptures de la couche endothéliale) est fortement suggéré par leur position subendothéliale aux endroits où la lamelle élastique semble intacte et d'autre part par la présence d'un conglomérat de cellules sanguines près d'une rupture. Ces différents points semblent donc indiquer que les leucocytes pénètrent activement la paroi collatérale de deux côtés.

La diapédèse dans la paroi aortique est observée par Hackensellner et al. (1965) et par Still (1967) dans des expériences de double ligature de l'artère carotide et après hypertension.

Les signes de métabolisme élevé dans la média, l'entrée des globules blancs et l'activité mitotique, suggèrent un mécanisme de réparation. Après un traumatisme mécanique de l'aorte chez le lapin, Björkerud (1969) a trouvé une activité mitotique intense.

Il est bien compréhensible que, grâce à leur calibre initial, les pièces 1 et 5 ne réagissent pas aux changements hémodynamiques.

Chapitre 4. La phase proliférative 8 - 12 semaines après implantation.

Cinq chiens du groupe 8 semaines et deux du groupe 12 semaines soit un total de 32 artères collatérales, ont été examinés.

L'apparence générale du système collatéral a fort changé entre la 3^{me} et la 8^{me} semaine post-opératoire.

Les artérioles, qui à 3 semaines étaient caractérisées par l'augmentation de leur diamètre et la minceur de leur paroi, montrent à ce nouveau stade à la fois un diamètre agrandi et une paroi épaisse et ressemblent à première vue à de petites artères.

Le nombre limité d'animaux qui faisaient partie de cette étude ne nous permet pas de déterminer s'il existe un changement éventuel du nombre des jonctions collatérales en développement entre le groupe de 3 semaines et le groupe de 8 - 12 semaines.

Schaper et al. (1969) dans un travail antérieur ont constaté que le nombre diminuait avec le temps après implantation. Il est probable que les artères collatérales les plus abimées dégénèrent complètement lorsque la circulation par voie collatérale est suffisante.

L'aspect morphologique dominant à ce stade de croissance de la paroi vasculaire est l'apparition d'une couche cellulaire située entre l'endothélium et la lamelle élastique.

Le terme "prolifération" est dans ce chapitre employé pour définir les événements qui sont situés dans la zone subendothéliale plutôt que dans le sens "synthèse de l'ADN et mitose", qui elle a son optimum vers la 3^{me} semaine post-opératoire (Schaper et al. 1971). Cette prolifération réelle a pour résultat l'augmentation du calibre des vaisseaux.

L'épaisseur de ces couches prolifératives dans l'espace subendothélial est très variable entre les différentes artères collatérales mais est toujours maximale dans le segment 4, probablement aux endroits qui étaient extrêmement lésés au moment de l'initiation du développement. Les segments environnants (2 et 3) présentent également l'épaississement intimal à un moindre degré. Seuls les segments 1 et 5 ont gardé leur apparence normale, non seulement par l'absence d'un épaississement subendothélial mais aussi par l'aspect inchangé des autres couches.

Leur diamètre intérieur (luminal) étant encore plus grand que celui des segments médians, il est peu probable qu'il doivent subir les conséquences de modifications hémodynamiques quelconques. Nous ne décrirons pas séparément les

changements dans les différents segments médians car les différences observées ne sont que quantitatives

Pourtant certains segments (de nouveau ceux qui possèdent le plus petit diamètre) ont des cellules endothéliales d'apparence très active, caractérisées par l'abondance de structures cytoplasmiques, comme le réticulum endoplasmique, le Golgi étendu, les corps multivésiculaires et un nombre considérable de petites vésicules, provenant probablement de la pinocytose.

Que l'activité pinocytaire est élevée apparaît clairement de l'observation de multiples vésicules pinocytaires en rosette. Une activité pinocytaire pareille a été observée par Hoff et Gottlob (1968).

La couche endothéliale semble le plus souvent intacte, sans espace intercellulaire et bien aplatie, conséquence de la perfusion du fixateur sous pression. La membrane basale paraît en général épaisse.

Cependant un bourgeonnement de cellules endothéliales dans la lumière vasculaire est parfois observé dans certaines parties des segments 3 et 4. L'ultrastructure de ces cellules ne fait pourtant pas penser à un gonflement cellulaire prénécrotique, au contraire le cytoplasme paraît très dense avec des organites très actifs. Ce phénomène ne peut être attribué à une perfusion inadéquate du fixateur car il n'existe que focalement. De telles invaginations ont également été décrites dans l'aorte abdominale après traumatisme mécanique (Hoff et Gottlob 1968).

Des protrusions amiboïdes du cytoplasme endothélial pénétrant l'espace sub-endothélial sont occasionnellement rencontrées.

Des leucocytes du type polymorphonucléaire sont trouvés aux différents stades de pénétration dans l'endothélium :

1. dans la lumière vasculaire, mais déjà attaché à la membrane plasmique d'une ou plusieurs cellules endothéliales ;
2. dans l'espace intercellulaire de deux cellules endothéliales et repoussant les extrémités endothéliales vers la média (fig. 10) ;
3. en position subendothéliale, calé entre l'endothélium et la lamelle élastique ;
4. libre dans l'épaississement intimal aux endroits où la lamelle élastique s'est évanouie.

L'examen de coupes sériées montre de façon nette qu'il s'agit ici d'un phénomène de passage actif de leucocytes. Cette observation implique que la réaction inflammatoire n'est pas encore terminée dans ces zones.

L'image la plus frappante et également la plus fréquemment observée entre 8 et 12 semaines postopératoires est celle d'une zone proliférative qui s'étend de la couche endothéliale jusqu'à la lamelle élastique interne, qui n'existe plus qu'en petits fragments.

L'examen de coupes semi-épaisses a montré que cette zone proliférative peut se présenter concentriquement ou en plaques focales, intéressant un dixième jusqu'à trois quarts de la circonférence du vaisseau. Il apparaît aussi que l'épaisseur de ces zones change d'un segment à l'autre et varie de 1 à 3 couches cellulaires au segment 2 jusqu'à 2 à 10 couches cellulaires au niveau des segments 3 et 4.

Dans cette zone, des cellules de quatre types peuvent être distinguées :

1. Des cellules musculaires typiques, facilement identifiées par l'abondance de myofibrilles et leurs zones d'attachements, la pauvreté d'autres organites cytoplasmiques, les vésicules de pinocytose le long de la membrane cellulaire et la présence d'une membrane basale entourant chaque cellule. L'architecture des myofibrilles de ces cellules est totalement différente de celle des cellules musculaires circulaires, et indique une position longitudinale ou hélicoïdale de ces cellules par rapport à l'axe du vaisseau (fig. 11). Quant à l'origine de ces cellules, il est plus que probable que des cellules normales musculaires issues de la média, pénètrent les espaces entre la lamelle élastique, fragmentée au préalable.
2. Des cellules musculaires modifiées : elles sont caractérisées par une fine couche de myofilaments située à la périphérie cellulaire, la masse de cytoplasme étant occupée par des structures du réticulum rugueux et lisse, des ribosomes libres, l'appareil de Golgi, des mitochondries et des corps denses et multivésiculaires. Elles présentent donc un cytoplasme qui apparemment est très similaire à celui des fibroblastes. Seule la présence d'un nombre limité de myofilaments avec leurs points d'attaches, l'existence de vésicules de pinocytose le long de la membrane plasmique et finalement une membrane basale d'épaisseur variable mais continue, rend possible la distinction avec les fibroblastes. Pour ce groupe de cellules, le terme cellule musculaire modifiée est adapté (Thomas 1963).
3. Des fibroblastes. Ces cellules sont bien distinguables grâce à leur chromatine très dense dans le noyau qui est parfois multilobé, l'abondance de réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi très développé et l'absence de myofilaments. La membrane plasmique est fréquemment tortueuse et ne contient que quelques vésicules pinocytaires. Ces cellules ne sont pas entourées d'une membrane basale.

En général, les cellules du type fibroblaste présentent des noyaux ovales et un cytoplasme allongé qui contient de longs rubans parallèles de réticulum endoplasmique. Le fait que des fibroblastes sont retrouvés dans la couche subendothéliale tandis que d'autres transitent par la couche musculaire circulaire laisse entrevoir leur origine adventitielle. Bien qu'il soit présomptueux de vouloir interpréter dynamiquement une image statique obtenue au microscope électronique, ce transit apparaît clairement lors de l'étude de coupes sériées qui montrent la position perpendiculaire de ces fibroblastes par rapport à la couche circulaire (fig. 13).

4. Des cellules leucocytaires. Le classement de certaines cellules dans le groupe fibroblastique ou le groupe monocyttaire n'est pas toujours facile car nous devons tenir compte avec le fait qu'aucune de ces cellules ne se trouve dans une situation normale et qu'elles peuvent être modifiées lors de leurs déplacements ou transformations. Les cellules du groupe monocyttaire sont rondes, avec le noyau lobulé situé excentriquement. Le cytoplasme est moins dense et contient parfois des globules à contenu amorphe. Ces derniers globules semblent être typiques pour des monocytes (Shively 1969). Les leucocytes polymorphonucléaires comme décrits plus haut, ont l'apparence classique que l'on retrouve chez les mammifères.

La position de ces différents types cellulaires apparaît désorganisée : le plus souvent les cellules sont très espacées les unes des autres et entourées par des quantités énormes de fibres de collagène (fig. 10). Parfois on rencontre des amas cellulaires non organisés, les cellules s'accrochant les unes aux autres par des protrusions cytoplasmiques. Le même ancrage est noté entre certaines cellules endothéliales et les cellules dans l'espace subendothélial.

Dans certaines zones de petites plaques de matériel élastique très dense sont fréquemment observées. Entre la couche subendothéliale et la média des fragments de la lamelle élastique originale se maintiennent. A quelques occasions, des fibroblastes typiques sont rencontrés parmi les cellules musculaires de la média.

Dans certains vaisseaux collatéraux, probablement aux endroits très endommagés au moment de l'occlusion, toute la paroi est uniquement composée de cellules désorganisées de toute origine. Une rangée bien organisée de cellules musculaires circulaires n'est pas présente.

La tunique adventitielle a fortement épaissi et contient beaucoup de cellules mésenchymales, jugées très actives par la présence de multiples protrusions

cytoplasmiques et de corps lysosomiaux secondaires et leur capacité de production de fibres collagènes.

Une des observations les plus frappantes est que la modification subendothéliale va toujours de pair avec l'absence de matériel élastique dans l'adventice. Les propriétés métaboliques normales des cellules mésenchymales ont vraisemblablement changé ce qui résulte entre autres dans l'arrêt de synthèse du matériel élastique. La diapédèse de leucocytes du côté adventiciel est très rarement observée.

Seule l'intensité des changements, au niveau de la prolifération subendothéliale, différencie morphologiquement les groupes de 8 et de 12 semaines. Ce dernier groupe semble évoluer dans deux directions. D'une part dans certains vaisseaux l'épaississement semble stationnaire ou même régressif (quand on le compare à celui du groupe 8 semaines) tandis que dans d'autres vaisseaux, cette zone proliférative est plus prononcée. Ce dernier phénomène est aussi bien rencontré sous forme concentrique que sous forme de plaques focales. Ces aires hyperproliférées sont composées d'un nombre limité de cellules du type musculaire situées longitudinalement par rapport à l'axe du vaisseau. Ces cellules sont très petites, d'un contenu plus dense que les cellules musculaires normales et elles possèdent beaucoup d'extensions pseudopodiques (fig. 12).

La plus grande partie de cette zone est occupée par des fibres collagènes qui courent dans toutes les directions ; en bref, l'apparence générale fait fort penser à la formation d'une cicatrice. Ces cellules ne produisent pas de matériel élastique mais sont entourées d'une membrane basale très épaisse. Il est possible qu'il s'agit ici d'une prolifération non contrôlée qui résulte finalement dans l'obstruction totale de la lumière vasculaire.

Des leucocytes polymorphonucléaires ne sont plus observés ni dans l'épaississement intimal stationnaire, ni dans le vaisseau hyperproliféré.

Chapitre 5. Signification des observations à 8 - 12 semaines post-opératoires.

Ce stade de la croissance vasculaire est caractérisé par la fragmentation générale de la lamelle élastique interne allant de pair avec l'apparition d'une zone subendothéliale contenant divers types cellulaires mal organisés et enrobés de matériel basal, de fibres collagènes en abondance et de plages denses de matière élastique immature. La prolifération de l'intima peut être interprétée comme une réaction générale provoquée dans la paroi artérielle contre toute lésion.

Björkerud a décrit un épaississement subintimal dans l'aorte traumatisée mécaniquement et il considère cette prolifération comme un mécanisme physiologique de réparation de la paroi. La prolifération cellulaire subintimale est également décrite comme réaction stéréotypique dans le stade précoce de l'athérosclérose (Parker 1966, Haust 1962, Thomas 1963, Scott 1967) et elle est souvent accompagnée de quantités abondantes de mucopolysaccharides (Still et Marriott 1964, Knieriem 1967). La prolifération de cellules musculaires lisses avec production de matériel fibreux a été observée dans l'aorte de rat lésée (Veress 1969). L'accumulation de matières extracellulaires comme le collagène, la substance élastique et les mucopolysaccharides est rapportée par Yarmolych (1968) dans une culture de cellules musculaires lisses de l'aorte. Il semble donc que la réaction de la paroi vasculaire contre différentes influences extérieures est assez stéréotypique.

Dans les artères collatérales des groupes 8 et 12 semaines nous avons observé quatre types de cellules qui participent à la formation de l'épaississement subendothélial : les cellules musculaires lisses normales, les cellules musculaires lisses modifiées, les cellules mésenchymales et les leucocytes.

L'origine et la fonction de ces cellules restent encore des points de discussion, et il existe différentes opinions dans la littérature. Haust (1960) croit que ces cellules proviennent des cellules endothéliales. Nous n'avons cependant aucune indication morphologique qui puisse soutenir cette hypothèse. D'autre part, une migration de cellules musculaires de la média vers l'espace subendothélial a été observé par Buck (1961), Thomas (1963) et Hoff et Gottlob (1968). Que ces cellules de l'épaississement subintimal puissent trouver leur origine dans le sang, c.-à-d. dériver de monocytes et de lymphocytes, a été souligné par Still et Marriott (1964) et par Still (1967) dans l'athérosclérose et dans l'hypertension expérimentales. Dans la conception de Wissler (1968) ces cellules seraient dérivées de cellules multifonctionnelles qui émigrent de la média. Cette cellule

mésenchymale multifonctionnelle serait apte à la production de substances qui forment le collagène, le matériel élastique et la substance basale. Elle serait capable de migration, de prolifération, de circulation et de colonisation. Cette hypothèse est principalement basée sur le fait que la plupart des cellules rencontrées dans l'épaississement subintimal sont du type musculaire normal ou modifié. L'apparence typique des cellules musculaires modifiées serait liée à leur activité synthétique élevée résultant dans la formation extracellulaire de matériel fibreux (Veress 1969).

Concernant l'origine de ces cellules, nos observations ont démontré :

1. l'existence dans l'espace subintimal de cellules qui sont morphologiquement identiques à celles de la média
2. la fragmentation de la lamelle élastique
3. la pénétration de leucocytes à travers la couche endothéliale
4. l'immigration de fibroblastes dans la média.

Il nous semble probable qu'aussi bien les fibroblastes, provenant de l'adventice, que les cellules musculaires pénétrant à travers les espaces de la lamelle élastique fragmentée. La cellule musculaire modifiée peut représenter la forme indifférenciée de la cellule musculaire de la média, ou une forme différenciée du fibroblaste. Cette dernière transformation nous paraît moins probable en admettant l'hypothèse de Wissler.

L'hyperprolifération, rencontrée dans certains segments médians au stade 12 semaines, représente peut-être la régression de certaines artères collatérales ou bien une hyperréaction contre la lésion qui était particulièrement forte à ces endroits. Quoique nous n'ayons observé d'activité mitotique des cellules musculaires que très exceptionnellement, nous croyons que la population croissante dans l'espace subintimal ne peut être expliqué que par la multiplication des cellules musculaires indifférenciées.

Le renforcement de la paroi du vaisseau par une abondance de fibres collagènes et de matériel élastique synthétisé "de novo", semble une réponse directe au stress hémodynamique responsable de la tension tangentielle exagérée dans cette paroi. D'autre part ce matériel peut remplacer la lamelle élastique originale.

Le fait que dans l'épaississement intimal les cellules sont généralement isolées les unes des autres, indique qu'elles ne jouent probablement pas un rôle actif dans la vasomotion.

Certaines cellules nécrotiques contenant de grandes vacuoles autophagiques, des amas de petits corps membranaires à densité variable, ont été observées. Parmi le matériel collagène et élastique, de nombreux corpuscules ronds sont rencontrés dans les espaces intercellulaires. Ces corpuscules sont probablement les résidus des cellules nécrotiques.

Le terme "matériel élastique immature" pour définir les plaquettes à contenu dense est employé à cause de leur ressemblance morphologique avec les images d'élastogénèse décrites par Haust et al. (1965) dans les vaisseaux humains en développement et par Ross et Bornstein (1969) dans le ligamentum nuchæ de veau au stade embryonnaire.

Chapitre 6. Les stades tardifs du développement - 1 et 2 ans après opération.

L'examen a porté sur trois chiens de 1 an et sur deux chiens de 2 ans post-opératoires ou un total de 28 vaisseaux collatéraux.

La plupart des vaisseaux collatéraux a atteint les dimensions d'une artère de diamètre luminal entre 600 - 1400 microns. Certains d'entre eux peuvent pourtant se classer après deux ans dans le groupe des grandes artères coronaires, leur diamètre atteint un minimum de 1500 microns à la hauteur de la jonction anastomosée. Les vasa vasorum sont fréquemment observés le long de ces derniers. Dans ce dernier groupe, certaines artères collatérales se ramifient et de nombreuses subbranches de différente grandeur sont visibles.

Le développement de ces vaisseaux n'est certes pas complet après un an, en effet à ce stade leur diamètre moyen est encore inférieur à celui trouvé à deux ans. Leur apparence générale en microscopie optique et électronique est assez normale, les différentes couches sont bien organisées, malgré la persistance d'une zone subintimale dans la plupart des segments médians. Les altérations persistantes observées peuvent être considérées comme étant la progression des événements qui sont observés à 8 - 12 semaines.

Les segments de souche et les segments terminaux ne montrent aucune altération.

En ce qui concerne les segments médians l'existence d'une couche subendothéliale est la seule indication qui nous permet de faire la distinction entre les vaisseaux normaux d'une part et les vaisseaux transformés ou ceux qui sont encore en voie de transformation d'autre part. L'image de la zone subintimale est pourtant fort différente de celle observée aux stades précoces. D'abord, les variations en épaisseur de la zone proliférative subintimale entre les différents segments de la zone médiane d'une même artère collatérale sont devenues minimales, n'excédant que rarement une épaisseur de deux à trois couches cellulaires (fig. 14). En se basant sur leur structure morphologique, il est pratiquement impossible de distinguer les segments 2, 3, 4. La majorité des cellules dans la couche subintimale sont du type musculaire entourées par une membrane basale. L'orientation de ces cellules est pourtant longitudinale ou hélicoïdale par rapport à l'axe du vaisseau (fig. 14). On rencontre très rarement des cellules musculaires modifiées et des fibroblastes parmi ces cellules.

Très significatif pour l'évolution vers un stade définitif est le réarrangement de ces cellules. Elles sont très proches les unes des autres ; des contacts entre

elles par extensions cytoplasmiques, sont fréquents.

Une autre observation qui nous a frappé est l'apparition de petites plaques de matériel élastique immature distribué en abondance dans les espaces intercellulaires à chaque hauteur. Il est encore possible de retrouver à certains endroits des fragments assez grands de la lamelle élastique originale. L'alignement endothélial et les couches circulaires de cellules musculaires ont un aspect tout à fait normal.

L'adventice qui a perdu son apparence hypertrophiée contient des fibroblastes et des fibrocytes normaux. La seule différence avec l'artère coronaire normale est une indigence certaine de matériel élastique en plaquettes (fig. 16). Les zones prolifératives subintimales sont à nouveau observées aussi bien concentriquement que focalement.

Pour les anastomoses de 2 ans, nous avons pourtant l'impression, quoique basée sur une estimation semi-quantitative, qu'il y a une diminution de la synthèse de matériel élastique et une augmentation de matériel collagène parmi les cellules remplissant les espaces intercellulaires dans la zone subendothéliale (fig. 15).

Chapitre 7. Interprétation des résultats obtenus lors de l'étude des stades avancés.

Certaines observations recueillies sur les vaisseaux collatéraux un et deux ans après leur développement, nous semblent importantes dans le contexte général de cette évolution.

1. L'apparence plus ou moins normalisée de l'endothélium, des couches circulaires du muscle lisse et de l'adventice.
2. L'aplatissement et la réorganisation de la zone subintimale.
3. L'abondance de matériel élastique synthétisé "de novo" dans cette zone et la persistance de fragments de la lamelle élastique interne entre la média et l'épaississement intimal après un an.
4. La perte quasi totale de lamelle élastique interne ainsi que du matériel élastique immature au profit de fibres collagènes après deux ans.

En gros, nous pouvons interpréter ces changements comme l'adaptation de la paroi vasculaire à la nouvelle situation hémodynamique. Il est difficile de juger, d'un point de vue morphologique, si cette adaptation est définitive après deux ans de développement. En tout cas, l'évolution ne semble pas terminée après un an ce qui est indiqué particulièrement par les changements qui ont lieu dans l'espace subintimal un an plus tard, c. -à-d. la régression de la zone en général et la disparition de multiples plaques élastiques, coïncidant avec l'apparition de nombreuses fibres de collagène.

D'autre part, il nous paraît parfaitement possible qu'une grande partie des anastomoses ne soit pas capable d'évoluer en artères d'aspect tout à fait normal, c. -à-d. sans la prolifération subintimale. En admettant cette possibilité, une question qui se pose est de savoir si l'existence d'une zone subendothéliale est inhérente au système collatéral et dans l'affirmative quel est son rôle fonctionnel.

Le critère qui nous semble d'importance primordiale est l'incapacité de la paroi de reconstruire une lamelle élastique interne. Il nous paraît admissible que seule une couche cellulaire, entourée de matériel à forte résistance en quantité, puisse se substituer efficacement à la lamelle élastique.

D'un autre côté, nous supposons que la position topographique de ces artères collatérales elle-même peut être responsable pour la persistance d'une couche subintimale dans les segments médians ; elles sont en effet disposées horizontalement dans le ventricule gauche. On peut imaginer qu'elles subissent des contraintes autres que les segments des vaisseaux artériels normaux et les segments de souche et terminaux qui eux sont disposés verticalement ou tangentiellement.

Pour répliquer de manière adéquate aux déformations provoquées par les contractions cardiaques et ne pas être limitée dans son fonctionnement normal, la paroi se fortifie d'une zone tampon qui est constituée de couches cellulaires en position longitudinale ou hélicoïdale par rapport à l'axe du vaisseau. La présence de matériel conjonctif ne peut qu'améliorer cette situation.

L'examen à périodes post-opératoires encore plus longues nous semble nécessaire pour répondre de façon définitive, à la question suivante : "une artère collatérale peut-elle acquérir oui ou non un aspect morphologique tout à fait semblable à celui de l'artère coronaire normale ?"

2me Partie : La cytochimie des hydrolases phosphatasiques dans les vaisseaux coronaires normaux, et dans les vaisseaux anastomosés à différents stades de développement.

Introduction

Il y a environ une trentaine d'années que Gömöri et Takamatsu ont indépendamment décrit une méthode pour mettre en évidence histochimiquement une hydrolase phosphatasique. Cette technique consiste à capter, par des métaux lourds, le groupe phosphate, libéré sous l'action enzymatique, en formant un précipité insoluble de phosphate de calcium dans le cas de la phosphatase alcaline (phosphomonoestérase I) (Gömöri 1939, Takamatsu 1939) ou de phosphate de plomb dans le cas de la phosphatase acide (phosphomonoestérase II) (Gömöri 1941, voir Gömöri 1958).

Depuis lors de nombreux travaux ont été consacrés à la localisation de ces enzymes dans différents tissus. Le perfectionnement des méthodes originales et le développement des autres, permettent la mise en évidence d'enzymes plus spécifiques n'hydrolysant qu'un seul ou un nombre limité de substrats phosphatasiques. Finalement ces méthodes ont été adaptées pour la localisation au niveau ultrastructural (Goldfischer et Novikoff 1964, Wachstein et Meisel 1956, 1957 ; Barka et Anderson 1965 ; Hugon et Borgers 1966 a & b).

La majorité des études cytochimiques faites sur le système vasculaire sanguin ont porté sur l'aorte et les artères à grand calibre ; par contre, les petites artères et les artérioles coronaires ont relativement peu été étudiées quant à leur contenu en phosphatases. Pour combler cette lacune, nous avons inclus dans ce mémoire une partie purement descriptive de la localisation des différentes phosphatases dans les vaisseaux artériels et veineux et le muscle cardiaque du chien normal.

Les améliorations, qui ont été apportées pendant les dernières années aux procédures de préparation pour la détection cytochimique d'activités enzymatiques, ont permis aux cytochimistes de les situer avec une assez grande précision au niveau ultrastructural.

A notre avis les facteurs suivants peuvent être responsables pour cette amélioration :

1. L'emploi de la technique de perfusion par voie sanguine pour la fixation du tissu à l'aide de fixatifs hautement purifiés, comme la glutaraldehyde fraîchement

distillé. Les enzymes sont immédiatement fixées in situ en préservant une quantité de l'activité enzymatique suffisamment grande pour leur détection cytochimique. De plus, par cette méthode, le détail morphologique ultrastructural est bien conservé.

2. Les méthodes d'incubation, récemment perfectionnées, permettant une localisation plus précise. La production de précipités artificiels d'origine non-enzymatique est fortement réduite
3. La disponibilité d'un groupe d'activateurs et d'inhibiteurs facilite largement l'interprétation de la spécificité des différentes enzymes.

En parallèle avec l'étude morphologique du développement des vaisseaux collatéraux coronaires chez le chien, des expériences cytochimiques ont été entreprises pour déterminer le comportement de certaines enzymes hydrolytiques durant ce processus.

Le but principal de cette investigation est d'acquérir des informations d'ordre qualitatif, et dans la mesure du possible, d'ordre quantitatif de la distribution des phosphatases non-spécifiques et spécifiques.

Nous avons choisi des phosphatases connues pour leur association avec des organites cellulaires importants comme la membrane plasmique (les nucléosides tri-, di- et monophosphatases ; la thiamine pyrophosphatase et la phosphatase alcaline) ; les mitochondries (l'adénosine triphosphatase) ; le réticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire (les nucléosides diphosphatases et la glucose-6-phosphatase) ; l'appareil de Golgi (la thiamine pyrophosphatase et la phosphatase acide) ; et les lysosomes (la phosphatase acide).

L'observation des multiples et importants changements dans l'ultrastructure des anastomoses en cours de transformation nous a incité à entreprendre cet essai cytochimique. Des phénomènes comme la lésion observée au stade précoce du développement, la réparation et la prolifération plus tard suggèrent fortement la participation active d'enzymes hydrolytiques dans les processus tels que la lyse cellulaire, la phagocytose, la réaction du tissu conjonctif, la pinocytose accélérée, la formation du matériel élastique et mucopolysaccharidique et la division cellulaire.

La localisation ultrastructurale de ces activités enzymatiques et leur comportement peuvent contribuer à une meilleure compréhension des processus métaboliques complexes qui se déroulent au sein du cytoplasme ou à la membrane plasmique des différents types cellulaires qui constituent la paroi vasculaire.

Chapitre 1. La méthodologie cytochimique.

1. Préparation de tissu vasculaire et myocardique pour les besoins de la cytochimie enzymatique.

A côté des expériences morphologiques 14 chiens ont été préparés pour les investigations cytochimiques en microscopie optique et électronique.

Les chiens ont été répartis en 6 groupes à savoir :

- 4 animaux contrôls
- 3 animaux 3 semaines après constriction
- 2 animaux 8 semaines après constriction
- 2 animaux 12 semaines après constriction
- 2 animaux 1 an après constriction
- 1 animal 2 ans après constriction

Le meilleur compromis pour préserver à la fois les activités enzymatiques et les détails morphologiques, est de fixer le cœur par perfusion de courte durée (5 à 7 minutes) et à basse température (4°C). La technique de la fixation par perfusion est appliquée comme décrit dans la première partie.

Après la perfusion de glutaraldehyde à 2 %, l'excès du fixateur est rincé en perfusant une solution de cacodylate de sodium 0,1 M additionné de sucrose 0,22 M. De petits segments des vaisseaux coronaires et de jonctions collatérales sont élevés comme décrit ailleurs. De plus, des échantillons de muscle myocardique sont pris "ad random" dans le ventricule gauche.

Après un séjour de 18 à 24 heures dans la même solution, les blocs de tissu sont rapidement surgelés. Des coupes d'une épaisseur de 35 microns sont prélevées au microtome à congélation et recueillies dans le même tampon et mises à incuber dans les milieux appropriés décrits plus loin.

Après un bref rinçage à froid dans une solution de sucrose 0,22 M tamponnée à pH 7,4 les coupes sont postfixées dans l' OsO_4 à 1,5 % en tampon cacodylate-sucrose pendant 30' à 4°C. La déshydratation est effectuée à froid (4°C) et l'embalage des coupes a lieu en épone selon la procédure habituelle.

Les coupes ultramincées préparées sur l'ultramicrotome III LKB sont postcolorées à l'acétate d'uranium à 0,5 % pendant 30 sec. et au nitrate de plomb pendant 45 sec. Pour une meilleure appréciation du précipité, (surtout dans les cas de réactions enzymatiques très faibles), les coupes sont aussi examinées non-colorées.

Simultanément des coupes semi-fines de 1 à 2 microns sont faites pour l'observation en microscopie optique. Afin de visualiser le produit de réaction, le

précipité de phosphate de plomb est converti par le sulphure d'ammonium en sulphure de plomb, lequel apparaît dans le microscope sous forme de précipité noir-brunâtre.

2. Milieux d'incubation.

En vue de déterminer les concentrations optimales des différents composants et de minimaliser les précipités artificiels d'origine non-enzymatique, nous avons tenté de garder toujours des solutions claires pendant toute la durée de la préparation et de l'incubation.

Pour maintenir ces milieux clairs une technique de préparation en deux temps a été développée (Hugon et al. 1970) :

1. La préparation d'un coupleur : les ions de plomb sont complexés au tampon tris-maléate qui agit comme chélateur. Chaque milieu contient la même concentration de nitrate de plomb et de tris-maléate.
2. L'addition du substrat et éventuellement de l'activateur approprié (nous n'avons pas obtenu un milieu indemne de précipité uniquement dans le cas de la phosphatase acide, probablement à cause de l'incapacité du tampon de complexer une aussi grande quantité d'ions de plomb à ce pH). Les valeurs pH optimales ont été établies auparavant par des analyses biochimiques.

Concentrations finales des différents composants dans les milieux :

La phosphatase alcaline :

- le complexe tampon tris-maléate
60 mM-nitrate de plomb 3 mM pH 9
 - β -glycérophosphate 11 mM
 - sucrose 220 mM
- Durée de l'incubation : 50 min. à 37°C.

La phosphatase acide :

- tris-maléate 60 mM - nitrate de plomb 3 mM pH 5
 - β -glycérophosphate 11 mM
 - sucrose 220 mM
- Durée de l'incubation : 30 min. à 37°C.

L'adénosine tri- et di-phosphatase :

- tris-maléate 60 mM - nitrate de plomb 3 mM pH 7,2
- 5'adénosine triphosphate ou adenosine diphosphate 2,3 mM
- sulphate de magnésium 5 mM
- sucrose 220 mM

Durée de l'incubation : 15 min. à 37°C.

La thiamine pyrophosphatase :

- tris-maléate 60 mM - nitrate de plomb 3 mM pH 7.2
- thiamine pyrophosphate 5,2 mM
- sulphate de manganèse 3 mM
- sucrose 220 mM

Durée de l'incubation : 30 min. & 37°C.

La glucose-6-phosphatase :

- tris-maléate 60 mM - nitrate de plomb 3 mM pH 6,7
- glucose-6-phosphate 3,6 mM
- sucrose 220 mM

Durée de l'incubation : 60 min. à 37°C.

La 5'-nucléotidase :

- tris-maléate 60 mM - nitrate de plomb 3 mM pH 7.2
- 5'-adénosine monophosphate 1,3 mM
- sulphate de manganèse 5 mM
- sucrose 220 mM

Durée de l'incubation : 45 min. à 37°C.

3. Les expériences témoins

En parallèle avec les expériences mentionnées plus haut, nous avons effectué les investigations de contrôle suivantes :

1. L'incubation dans les milieux dépourvus de substrats.
2. Les substrats spécifiques comme l'ATP, l'ADP, l'AMP, le TPP et le G-6-P ont été remplacés dans les milieux appropriés par le β -glycérophosphate.
3. L'addition d'inhibiteurs des activités enzymatiques : fluorure de sodium 10 mM (ACPase) ; chlorure de cuivre 2 mM et fluorure de sodium 100 mM (5'-nucléotidase) ; ouabaine 0.5 mM, N-ethylmaléimide 10 mM, DTNB 1 mM, PCMB 10 mM

(nucléoside tri- et diphosphatases) ; 25 mM fluorure de sodium (TPPase) ; 1-phenyl-alamine 50 mM, cysteine 5 mM, cyanure de potassium 10 mM (ACPase).

4. Critique de la méthodologie.

Les méthodes employées pour la détermination des phosphatases non-spécifiques n'offrent pas de difficultés particulières dans l'interprétation de leur localisation et actuellement la validité des méthodes de Gömöri et de leurs modifications est bien établie.

Par contre, la valeur des techniques pour la mise en évidence de l'activité des nucléosides phosphatases spécifiques est fortement discutée. C'est surtout la méthode de Wachstein et Meisel pour la détection cytochimique de l'ATPase qui est mise en cause. Les nombreux travaux du groupe Rosenthal (Rosenthal et al. 1966, 1969a, 1969b, 1970 ; Moses et al. 1966 ; Moses et Rosenthal (Rosenthal et al. et al. 1969) ont mis en doute la localisation réelle de l'ATPase avec le milieu au plomb. Ces auteurs ont souligné les possibilités de reproduire des artéfacts dus à l'hydrolyse spontanée de l'ATP qui apparaît fortement accélérée en présence d'ions de plomb.

Leurs résultats ont été récemment confirmés par les travaux de Mietkiewski et al. (1970). Novikoff, à différentes reprises (1967, 1970, 1971) a contesté ces dernières conclusions et il a tenté d'affaiblir l'atmosphère négative créée autour de la méthode de Wachstein et Meisel par Rosenthal et collaborateurs.

Dans nos propres expériences, nous avons essayé de diminuer le degré d'hydrolyse non-enzymatique de l'ATP et autres substrats, en complexant le plomb labilement à un agent chelateur avant d'ajouter le substrat. Nous croyons avoir accompli deux choses : d'abord la diminution de l'inhibition par le plomb de l'activité enzymatique et en second lieu une diminution considérable de l'effet de plomb sur l'hydrolyse spontanée des substrats.

La première supposition est soutenue par le fait que des activités enzymatiques de l'ATPase mitochondriale et la G-6-Pase (connue comme très sensible au plomb) ont bien survécu ce traitement.

L'appoint biochimique nous semblait nécessaire pour supporter la deuxième conception. Nos premiers résultats des dosages biochimiques confirment d'une part les observations de Rosenthal et al. et d'autre part la situation améliorée en modifiant la méthode comme décrit ailleurs.

Un autre point de discussion dans la littérature concerne la corrélation entre le degré de la fixation et la préservation optimale des activités phosphatasiques. Dans les expériences antérieures (Hugon et Borgers 1969 a et b), nous avons constaté qu'une fixation rapide de durée moyenne préservait le mieux les enzymes. Lors de ces expériences, nous avons remarqué également que des résultats négatifs de localisation pouvaient résulter aussi bien d'une fixation trop courte que trop longue. En d'autres mots, une fixation courte (immersion de 2 à 5 min. dans le fixateur) permet le déplacement des enzymes, insuffisamment fixées, ou bien la préservation d'une activité trop grande.

Dans ce dernier cas, la génération des groupes phosphates inorganiques est trop importante pour la captation adéquate par les ions de plomb. Ce phénomène est visualisé par l'apparition d'une expèce de fumée blanche qui sort du tissu. Dans l'autre cas, une fixation de longue durée (2 heures de contact avec le fixateur) inhibe vraisemblablement la plus grande partie ou même la totalité de l'activité enzymatique.

Nous croyons avoir trouvé un compromis acceptable concernant ces point de discussion sur la méthodologie de la cytochimie ultrastructurale.

Chapitre 2. La distribution des phosphatases dans les vaisseaux coronaires et le muscle myocardique chez le chien normal.

Les activités enzymatiques sont estimées en gros sur des coupes semi-fines de 1 - 2 microns en microscopie optique. Les quantités de précipité de sulphure de plomb ont été évaluées visuellement et exprimées comme activité faible, modérée ou forte. Les résultats sont résumés dans la table 1.

1. Les artères et les artérioles coronaires

A. L'ENDOTHELIUM

La membrane plasmatique des cellules endothéliales est très riche en enzymes hydrolysant l'ATP, l'ADP et le TPP. L'activité la plus forte est montrée aux jonctions intercellulaires et dans les nombreuses vésicules pinocytaires (fig. 17, 22).

En doublant le temps d'incubation dans les essais de l'ADPase et de la TPPase, quelques cellules montrent une activité faible dans l'enveloppe nucléaire et dans le réticulum endoplasmique.

L'activité phosphatasique alcaline et 5'-nucléotidasique n'est pas présente. Les quelques corps lysosomiaux observés dans les cellules endothéliales présentent une activité modérée de phosphatase acide. Les vésicules de pinocytose, les jonctions intercellulaires et la membrane basale, trouvées réactives pour l'ACPase dans certains vaisseaux d'autres espèces, sont indemnes de précipité chez le chien.

Quant à l'appareil de Golgi, quelques lamelles et vésicules sont colorées par l'activité de la thiaminepyrophosphatase (fig. 22) et de la phosphatase acide.

Nous avons noté une distribution très uniforme de l'activité glucose-6-phosphatasique à l'intérieur des tubules du réticulum endoplasmique et dans l'enveloppe nucléaire (fig. 39)

B. LA MEDIA

L'activité vis-à-vis de l'ATP, l'ADP et le TPP est visualisée dans les vésicules de pinocytose le long de la membrane plasmatique des cellules musculaires lisses (fig. 17). Une certaine quantité de précipité est toujours présente dans les espaces intercellulaires de la média. Nous interprétons ce précipité comme étant la conséquence d'une captation inadéquate des ions phosphates par le plomb.

Table 1

Estimations semi-quantitatives des activités enzymatiques dans le système coronarien et le muscle cardiaque normal sur coupes semi-fines en microscopie optique. Les quantités de précipité de sulphure de plomb sont exprimées comme :
 - = nulle ; + = faible ; ++ = modérée ; +++ = forte.

	β - GP pH 9	β - GP pH 7.2	ATP pH 7.2	ADP pH 7.2	TPP pH 7.2	AMP pH 7.2	G-6-P pH 6.7
<u>Artères et artérioles</u>							
intima	-	+	+++	++	+++	-	+
média	-	+	+++	++	++	-	+
adventitia	-	++	+++	+	+	++	++
<u>Artérioles terminales et grandes capillaires</u>							
intima	++	+	+++	++	+++	+	+
média	-	++	+++	++	++	-	+
adventitia	-	++	+++	+	+	+++	++
<u>Myocarde</u>							
cell. myocardiques	-	+	+++	+	+	-	++
cell. interstitielles	-	+	+++	+	+	+++	++
petits capillaires	-	+	++	+	+	-	+

Les ions capteurs ne sont probablement pas capables de pénétrer à vitesse suffisamment grande la membrane basale très épaisse qui entoure chaque cellule musculaire. Quelques mitochondries montrent occasionnellement une réaction dans les matrices intercrystalles lors des expériences de l'ATPase. Nous n'avons pas observé une réactivité quelconque localisée sur les myofilaments.

Comme c'était le cas dans la couche endothéliale, la phosphatase alcaline et la 5'-nucléotidase ne sont apparemment pas présentes dans la média.

Les quelques lysosomes et les rares cytolysosomes, observés dans les cellules musculaires, possèdent de la phosphatase acide (fig. 33). On peut mettre en évidence également un faible précipité de phosphate de plomb dans une ou deux saccules et dans quelques vésicules de l'appareil golgien pour l'ACPase et la TPPase.

Les profils du réticulum endoplasmique et les membranes nucléaires sont colorés pour la G-6-Pase (fig. 39).

C. L'ADVENTICE

Une forte activité de l'ATPase est observée le long de la membrane plasmatique des cellules mésenchymales de l'adventice. Les mêmes sites sont faiblement marqués pour l'ADPase et la TPPase.

En plus, une activité très importante est localisée dans les espaces entre les membranes plasmatiques des nerfs amyéliniques et les cellules de Schwann (fig. 18). Quelques fibroblastes montrent une activité envers l'ADP et le TPP dans l'enveloppe nucléaire et le réticulum lisse, ceci tout de même est rarement observé.

Les cellules du tissu conjonctif sont les seuls sites de la paroi artérielle où l'on a retrouvé de l'activité 5'-nucléotidasique. Le produit de réaction est situé du côté externe de la membrane plasmatique et à l'intérieur des vésicules de pinocytose, peu nombreuses dans ces cellules. Le précipité apparaît le plus concentré aux zones de contact intime entre deux cellules, et l'intensité de la réaction est d'autant plus grande que les cellules examinées sont plus proches du myocarde.

Les cellules du type fibroblaste ou fibrocyte qui entourent un plexus nerveux sont fortement chargées en phosphate de plomb (fig. 27). Nous avons trouvé une répartition topographique identique pour les trois mononucléotides (AMP, IMP, UMP) qui ont été employés comme substrats de la 5'-nucléotidase. La seule différence se remarque dans l'intensité de l'activité, l'AMP étant beaucoup plus vite hydrolysé que les deux autres substrats.

Les cellules mésenchymales montrent une activité d'ACPase très irrégulière : certaines cellules contiennent 3 - 5 corps lysosomiaux réactifs tandis que d'autres apparemment sont indemnes d'activité. Cela pourrait s'expliquer par la teneur enzymatique différente ou par un simple fait de hasard, c.-à-d. les cellules sont coupées à des niveaux différents.

Les fibroblastes, du moins ceux caractérisés par un réticulum endoplasmique abondant, possèdent la plus grande charge en G-6-Pase (fig. 41).

Bien que des différences en intensité de réaction restent importantes entre les cellules de la lignée mésenchymale, chaque cellule montre le produit de réaction dans l'enveloppe nucléaire et dans le réticulum endoplasmique rugueux et lisse.

Nous n'avons pas retrouvé de la phosphatase alcaline dans l'adventice des artères.

2. Les artérioles terminales et les capillaires

Les vaisseaux sanguins artériels à diamètre luminal en-dessous de 25 microns font partie de ce groupe.

A. L'ENDOTHELIUM

Les activités enzymatiques de l'ATPase, de l'ADPase et de la TPPase localisées au niveau de la membrane plasmatique, restent très similaires à celles trouvées dans les artères de grandeur moyenne ou large. Les jonctions myo-endothéliales qui sont nombreuses dans les artérioles terminales montrent un précipité très important (fig. 23). L'endothélium se colore sur toute la longueur des capillaires. Les vésicules de pinocytose, localisées du côté basal des cellules endothéliales des artérioles et des capillaires réagissent plus intensément que celles situées du côté luminal.

Les membranes plasmatiques de la couche endothéliale sont marquées de la même façon pour AlPase, mais uniquement celles des vaisseaux de calibre de 8 - 25 microns de diamètre luminal (fig. 30, 31). La réactivité vis-à-vis de l'AMP se situe aux mêmes sites que la phosphatase alcaline, mais de façon moins marquée. L'activité de l'ACPase et de la G-6-Pase ressemble à celle trouvée dans les artères.

B. LA MEDIA

La couche monocellulaire qui constitue la média des artérioles terminales laisse apparaître une teneur en enzymes phosphatasiques égale à celle présente dans

la média des artères coronaires.

C. L'ADVENTICE

A l'exception d'une plus forte réaction de la 5'-nucléotidase sur les membranes plasmiques des cellules mésenchymales (fig. 26), toutes les autres phosphatases se comportent comme les enzymes de l'adventice d'artères à grand calibre.

3. Le système veineux

En général, les activités phosphatasiques révélées cytochimiquement ne diffèrent guère de celles décrites pour le système artériel.

L'activité polyphosphatasique vis-à-vis de l'ATP, de l'ADP et du TPP localisée au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses (si présentes) et des cellules adventitielles est assez forte. La phosphatase alcaline n'est pas retrouvée dans les vaisseaux veineux.

Les quelques lysosomes et certains éléments de l'appareil golgien réagissent modérément pour l'ACPase.

La glucose-6-phosphatase, bien que uniformément distribuée dans les éléments du réticulum et dans l'enveloppe nucléaire de chaque cellule de la paroi vasculaire, n'est cependant présente qu'en faible quantité.

4. Le muscle myocardique

En variant la procédure de fixation, nous sommes parvenus à mettre en évidence dans les cellules musculaires striées, deux activités majeures d'adénosine triphosphatasique et ce dans deux sites différents.

Après fixation de deux heures l'activité de l'ATPase est localisée exclusivement dans les citernes subsarcolemmales et dans les éléments latéraux des diades et triades. D'autre part en employant du tissu brièvement fixé pendant 5 min. une activité additionnelle est notée dans les matrices intercristalles des mitochondries. Les myofilaments ne sont jamais trouvés positifs pour l'ATPase.

Les extensions des cellules mésenchymales situées entre les cellules myocardiques réagissent intensivement pour l'ATPase, mais moins fort dans le cas de l'ADPase et de la TPPase. L'appareil de Golgi, composé de 2 à 4 petites lamelles et d'un nombre limité de vésicules, est fort chargé en TPPase (fig. 23). Avec l'ADP comme substrat, cet organe n'est coloré que faiblement.

Les lysosomes myocardiques, peu abondants, possèdent de l'activité phosphatase acide.

La 5'-nucléotidase absente dans les cellules musculaires striées mêmes, est très active au niveau des cellules interstitielles ou périvasculaires, qui entourent les petits vaisseaux sanguins myocardiques et longent les cellules myocardiques par leurs extensions pseudopodiques.

La phosphatase alcaline n'est pas retrouvée dans les cellules myocardiques. Par contre, les tubules du réticulum sarcoplasmique, les éléments latéraux des diades et triades, les saccules subsarcolemmales et l'enveloppe nucléaire sont constamment trouvés réactifs pour la G-6-Pase (fig. 40).

Chapitre 3. Les expériences de contrôle.

1. Dans tous les cas les coupes témoins incubées sans substrats ne montrent aucun précipité, ce qui veut dire que le plomb ne précipite pas spontanément sur les structures cellulaires ou qu'il n'y a pas de phosphate endogène qui puisse induire une localisation de phosphate de plomb ne provenant pas d'une catalysation enzymatique.
2. Le remplacement des substrats spécifiques (ATP, ADP, AMP, TPP et G-6-P) par une quantité équimolaire de glycérophosphate dans les milieux appropriés permet uniquement la localisation de l'activité restante des phosphatases acide et alcaline qui interfère à un pH pratiquement neutre.
3. L'emploi d'inhibiteurs. L'activité de la phosphatase acide est complètement inhibée par 10 mM de fluorure, ajouté au milieu d'incubation.
L'ouabaine et le N-éthylmaléimide n'ont pas d'influence sur l'activité nucléoside phosphatasique.
L'activité de la 5'-nucléotidase de la membrane plasmatisque des cellules mésenchymales a totalement disparu en présence de 100 mM de fluorure de sodium, bien que l'activité dans les cellules endothéliales reste inchangée. Cette dernière observation suggère nettement une action interférente de la phosphatase alcaline sur le substrat AMP dans les cellules endothéliales. La présence d'ions de cuivre (2 mM) supprime complètement l'activité 5'-nucléotidasique.
L'appareil de Golgi ne montre aucun précipité de la réaction TPPasique en présence de fluorure de sodium (25 mM). Les essais avec d'autres inhibiteurs (mentionnés dans les méthodes) n'ont pas donné de résultats satisfaisants à cause de leur action avec les ions de plomb dans le milieu d'incubation ou bien à cause de leur capacité limitée d'inhiber complètement l'une ou l'autre activité enzymatique dans le tissu vasculaire ou myocardique.

Chapitre 4. Les rôles physiologiques des hydrolases phosphatasiques.

On peut déduire de la distribution enzymatique que des processus métaboliques importants médiés par l'action hydrolasique se situent aussi bien dans l'intima, la média et l'adventice des vaisseaux coronaires.

Les résultats indiquent de plus, que certaines enzymes ne sont pas distribuées "ad random" dans tous les vaisseaux mais qu'elles sont uniquement présentes dans une classe de vaisseaux bien définis, comme la phosphatase alcaline dans l'endothélium des vaisseaux de résistance. D'autre part, des variations en intensité de la réaction le long du vaisseau sont observées, par exemple : l'activité dans l'adventice de la 5'-nucléotidase est en rapport inverse avec le calibre des vaisseaux, l'activité étant la plus grande dans les vaisseaux de petit calibre.

Bien que la signification physiologique de ces localisations soit loin d'être élucidée, quelques unes de nos suggestions contribueront peut-être à une meilleure compréhension du fonctionnement soupçonné auparavant.

1. L'activité polyphosphatasique.

Les multiples travaux faits sur différents types de vaisseaux sanguins (Freiman et Kaplan 1960; Lojda 1962; Marchesi et Barrnett 1963; Zemlenyi 1965 et autres) ont démontré l'abondance de l'ATPase dans la paroi artérielle.

La distribution uniforme d'activité vis-à-vis de l'ATD, l'ADP et le TPP dans les membranes plasmiques et les vésicules de pinocytose des cellules endothéliales, musculaires et mésenchymales de tous les vaisseaux coronaires du chien, semble en accord avec la conception de Freiman et Kaplan.

Ces auteurs pensent qu'une polyphosphatase serait responsable de l'hydrolyse de ces substrats au niveau des membranes cellulaires.

Bien que le rôle de cette polyphosphatase reste encore spéculatif, sa localisation suggère fort une participation dans le transport actif au travers de la membrane plasmique. L'ATP et l'ADP participent dans la synthèse de phospholipides (Brady et Tower 1960). La présence de l'ATPase et de l'ADPase est probablement en relation avec la formation de membranes "de novo", celles-ci étant nécessaires pour la production des vésicules de pinocytose (Torack et Barrnett 1964). La fonction de transport des métabolites par ces vésicules, comme proposé par Moore et Ruska (1957) est favorisée davantage par la présence de l'ATPase dans ces organites.

2. L'ATPase spécifique.

Les éléments latéraux des diades et triades et les saccules subsarcolemnales sont admis comme étant les parties hautement spécialisées du réticulum sarcoplasmique. La présence d'une ATPase à ces endroits peut être mise en rapport avec le processus du couplage excitation contraction dans le muscle cardiaque en fournissant l'énergie pour le fonctionnement de la pompe calcique. (Hasselback 1964; Rostgaard et Behnke 1965; Essner et al. 1965; Ferrans et al. 1969).

L'ATPase mitochondriale a été démontrée dans le myocarde du rat (Tice et Barrnett 1962) et dans le muscle squelettique du lapin (Grossmann et Heitkamp 1968).

Ces auteurs pensent que l'ATP est déphosphorilé dans les mitochondries pour acquérir d'une part l'énergie nécessaire aux réactions de biosynthèse et de catabolisme et d'autre part l'ADP qui contrôle la respiration mitochondriale par son habilité à capter les groupements phosphates.

De l'activité adénosine triphosphatasique liée aux myofilaments n'est jamais retrouvée au cours de nos expériences, ceci est probablement dû à l'action inhibitrice du fixateur employé (Tice et Barrnett 1962).

3. La nucléoside diphosphatase et la thiamine pyrophosphatase.

Les observations lors des essais de l'ADPase et de la TPPase suggèrent que les substrats ADP et TPP sont hydrolysés par différentes enzymes :

1. par l'action d'une polyphosphatase, décrite plus haut. Hess et Staubli (1963) ont observé de l'activité vis-à-vis du TPP dans les portions périphériques de l'endothélium de l'aorte du rat. La TPPase est également retrouvée dans les vésicules de pinocytose des cellules endothéliales et musculaires lisses des artères et dans l'appareil golgien des cellules myocardiques de l'atrium de rat (Ferrans et al. 1969);
2. par une nucléoside-diphosphatase, peu active dans le réticulum endoplasmique, l'enveloppe nucléaire et l'appareil de Golgi;
3. par une forte activité spécifique d'une thiamine pyrophosphatase dans l'appareil de Golgi.

Goldfischer et al. (1964) et Dauwalder et al. (1969) rapportent la présence d'activité de la nucléoside diphosphatase et de la thiamine pyrophosphatase dans

l'appareil golgien. Allen (1963) a montré par analyse électrophorétique que la NDPase et la TPPase sont deux enzymes à propriétés différentes. Il a noté que la NDPase, connue comme marqueur du réticulum endoplasmique, possède une capacité très limitée d'hydrolyser le TPP et qu'une très grande part de l'activité hydrolysante vis-à-vis de ce substrat est attribuée à la TPPase.

La TPPase a généralement été regardée comme marqueur typique de l'appareil golgien (Novikoff et al. 1962, Goldfischer et al. 1964).

4. La phosphatase acide.

Le rôle physiologique de la phosphatase acide dans les processus lytiques, la phagocytose et la pinocytose, est bien établi par la contribution des travaux biochimiques de de Duve et collaborateurs (1955, 1966) et les travaux cytochimiques de Novikoff (1963), Ericsson (1969) et Daems (1969).

La faible activité que l'on retrouve dans les cellules de l'intima, de la média et du myocarde nous semble parfaitement compréhensible pour ce type cellulaire : toutes ces cellules font partie d'une population non-proliférative. D'autre part, l'activité plus importante présente dans les cellules mésenchymales de l'adventice, est probablement liée à leur capacité de phagocyter et d'hydrolyser les matériaux étrangers qui entrent la paroi vasculaire.

D'un autre côté, nos observations sur l'ACPase dans l'endothélium des vaisseaux coronaires ne confirment pas les localisations trouvées dans différents vaisseaux chez le lapin (Hoff et Graf 1966; Hoff 1968) et chez le rat (Lemeunier et al. 1969), notamment dans les vésicules de pinocytose, les membranes basales et les jonctions intercellulaires.

5. La phosphatase alcaline.

Il semble bien établi que l'AlPase n'est pas présente dans l'endothélium et la média des grandes artères ou de l'aorte, mais que l'activité se localise dans les vasa vasorum (Adams, 1967). Le rôle de l'AlPase dans la paroi vasculaire a toujours été décrit vaguement comme étant impliqué dans le passage de substances au travers de la paroi. Sa localisation dans l'endothélium des vaisseaux de résistance (à diamètre luminal entre 8 et 25 microns) est assez frappante. Ceci est en contradiction avec les observations de Oka et Angrist (1965) et de Gardner et Laing (1965) qui ont rapporté une positivité constante de l'AlPase dans l'endothélium des capillaires du muscle cardiaque de rat.

La phosphatase alcaline du muscle squelettique de rat, de lapin et d'homme étudiée par Romanul et Bannister (1962) est retrouvée dans les branches artériolaires qui ont 25 microns de diamètre luminal. L'activité apparaît abruptement à l'endroit de branchement du vaisseau de souche et s'affaiblit graduellement. Les branches plus petites se colorent plus intensément.

Récemment, Haussler et al. (1970) ont mentionné que la phosphatase alcaline intestinale est reliée au transport de calcium de façon fondamentale.

L'existence d'un tel rapport au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux doit encore être démontrée.

6. La 5'-nucléotidase

La distribution de la 5'-nucléotidase a été le sujet de beaucoup de travaux dans les domaines de la biochimie, l'histochimie et la cytochimie (Achmed et Reis 1958; Essner et al. 1958; Hardonk et Koudstaal 1968; Newmann et al. 1950; Wachstein et Meisel 1957). En ce qui concerne la présence de cette enzyme dans les vaisseaux sanguins, les études faites sur matériel humain et animal font apparaître des différences considérables d'activité de 5'-nucléotidase entre les différentes espèces et entre les différents types de vaisseaux sanguins d'une même espèce (Adams 1967; Zemlenyi 1968; Zemlenyi et al. 1963).

Contrairement aux observations sur l'aorte, les artères pulmonaires, les artères intestinales et les artères coronaires de certaines espèces d'animaux (Adams 1967; Zemlenyi 1968, Borgers non publiées), nous n'avons pas retrouvé l'activité 5'-nucléotidasique dans l'intima et la média des vaisseaux coronaires chez le chien.

Nous avons attaché une importance spéciale à la localisation au niveau de la membrane plasmatique des cellules mésenchymales périvasculaires. La 5'-nucléotidase, l'enzyme hydrolytique qui est responsable pour la production de l'adénosine est proposé dans l'hypothèse de Berne (Berne 1963; Katori et Berne 1966, Rubio et Berne 1969) comme une enzyme d'importance primordiale dans la régulation métabolique du débit coronaire. L'adénosine, continuellement libéré au niveau des cellules myocardiques, est présent en plus grande quantité dans le fluide interstitiel dans le cas d'hypoxie. L'adénosine est supposé réagir au niveau des cellules musculaires lisses des artérioles environnantes et provoquer une vasodilation (restaurant ainsi la balance de la tension d'oxygène).

Pour supporter son hypothèse Berne s'est basé sur des résultats cytochimiques recueillis chez le rat. Nous avons démontré dans le présent mémoire et dans un travail antérieur (Borgers et al. 1971 soumis à la publication) que la cellule myocardique du chien et de l'humain ne possède aucune activité 5'-nucléotidasique. En outre, l'activité envers l'AMP dans le myocarde de rat est localisée aux mêmes endroits que l'activité de la phosphatase alcaline. Les expériences de contrôle, effectuées lors de ces derniers essais ont démontré qu'il n'existe probablement pas non plus 5'-nucléotidase réelle dans les cellules myocardiques chez le rat. Nos observations ont prouvé que dans trois différentes espèces il y a un même type de cellule qui concentre toute l'activité 5'-nucléotidasique : la cellule mésenchymale périvasculaire.

Sa position topographique entre le myocarde et les vaisseaux de résistance, sa forme amibolde et son équipement biochimique, c. -à-d. la présence à sa membrane plasmatique de l'enzyme-clé, pourraient assigner à cette cellule un rôle dans la détection de l'oxygène disponible et elle réglerait le taux d'adénosine nécessaire pour une vasomotion adéquate. Cette conception est totalement compatible avec l'hypothèse de Berne et avec la théorie de Lochner (1962) sur les récepteurs dans la régulation coronaire.

Nous basant sur les images cytochimiques, nous supposons que le mécanisme tel que proposé par Berne ne se déroule pas au niveau du muscle myocardique mais plutôt dans les cellules périvasculaires voisines. D'ailleurs, il est difficile d'admettre que la formation de l'adénosine par l'action intermédiaire de la 5'-nucléotidase puisse s'effectuer dans la cellule myocardique elle-même. Cette réaction hydrolytique est fortement inhibée par l'ATP (Burger et Lowenstein 1967) et les concentrations de l'ATP dans ces cellules ne tombent jamais en dessous de la concentration inhibitrice, même pas dans le cas d'hypoxie sévère ou prolongée (Kubler 1969 ; Pool et al. 1966).

Bien qu'il soit dangereux d'interpréter quantitativement les résultats cytochimiques, nous pensons que le nombre de cellules mésenchymales suffit amplement pour expliquer la quantité d'adénosine dans le fluide extracellulaire (10^{-7} - 10^{-9} M) comme trouvée par Rubio et Berne (1969).

Douglas a rapporté que pendant la sécrétion des catécholamines une quantité équimolaire d'ATP est libérée. L'activité importante de 5'-nucléotidase présente dans les cellules mésenchymales, qui entourent les cellules nerveuses, pourrait servir à la déphosphorylation de cet ATP jusqu'à l'adénosine et suggère un moyen supplémentaire de produire de l'adénosine pendant la stimulation nerveuse.

7. La glucose-6-phosphatase.

La présence d'une phosphatase qui hydrolyse spécifiquement le G-6-P quand le glycogène est converti en glucose a été postulée par Gori et collaborateurs en 1939. A l'aide des essais biochimiques, de Duve et al. (1955) ont retrouvé l'activité dans la fraction microsomiale. Depuis lors des études multiples ont été consacrées au domaine de l'histochimie et de la cytochimie et indiquent que dans les organes différents comme le foie, le rein, le pancréas, l'intestin et autres, l'activité enzymatique est associée au réticulum endoplasmique et à l'enveloppe nucléaire (Wachstein et Meisel 1956, 1957 ; Herman et Padykula 1956, Tice et Barrnett 1962, Goldfischer et al. 1964 ; Ericsson 1966 ; Hugon et al. 1970).

La distribution dans les vaisseaux sanguins, d'autre part, est beaucoup moins étudiée. Nous avons retrouvé une localisation très uniforme dans toute la paroi vasculaire et dans le muscle cardiaque. La localisation spécifique à l'intérieur des tubules réticulaires et dans la membrane nucléaire est en accord avec les images de Tice et Barrnett. Ils concluent que cette distribution particulière de la G-6-Pase est plausible en admettant que le réticulum endoplasmique fonctionne comme un système de transport de la glucose.

En plus, la relation entre le réticulum et l'enveloppe nucléaire est supportée par la présence de la G-6-Pase dans les deux organites.

Chapitre 5. La distribution des phosphatases dans les vaisseaux anastomosés à différents stades de développement.

Les estimations des activités enzymatiques dans les diverses couches de la paroi vasculaire des anastomoses, à 3, 8, 12, 52 et 104 semaines post-opératoires, faites en microscopie optique sont reprises dans la table 2. Comme pour la table 1, les activités ont été classées en activité faible, modérée ou forte.

1. L'adénosine tri- et diphosphatases

Dans le stade précoce du développement, nous avons noté des changements importants dans le comportement de ces enzymes.

L'endothélium a conservé son activité dans la membrane plasmique ; l'activité au niveau des jonctions intercellulaires et des vésicules de pinocytose semble même plus importante (fig. 20). Dans les segments de souche et d'entrée et dans les parties médianes les moins lésées, là où les cellules musculaires ont conservé leur organisation normale, le produit de réaction apparaît inchangé.

D'autre part, aux sites très altérés les cellules musculaires ont complètement perdu leur activité (fig. 20). Une perte similaire est constatée dans les cellules fibroblastiques, infiltrées dans la média ou se trouvant dans la partie apicale de l'adventice. Les cellules mésenchymales situées dans les couches plus profondes de l'adventice montrent le précipité habituel au niveau de la membrane plasmique.

Aucun changement n'est observé dans les cellules nerveuses. Tandis que les cellules sanguines ne montrent pas la moindre activité.

L'activité adénosine triphosphatique dans les matrices mitochondriales et dans certains éléments du réticulum sarcoplasmique des cellules myocardiques, situées très près des vaisseaux collatéraux, est très variable d'une cellule à l'autre. Certaines cellules myocardiques dégénérées, très fréquemment rencontrées aux alentours des vaisseaux collatéraux, et caractérisées par la présence intracytoplasmique d'un grand nombre de globules lipidiques, sont totalement dépourvues de produit de réaction tandis que d'autres cellules apparemment en meilleur état montrent une activité normale.

Pendant la phase proliférative (8-12 semaines post-opératoires) les changements en réactivité envers l'ATP et l'ADP se situent dans l'épaississement subendothélial. Les cellules musculaires modifiées et longitudinales, les fibroblastes et les leucocytes infiltrés qui occupent cette zone, sont tous dépourvus d'activité

TABLE 2. Activités enzymatiques dans les anastomoses interartérielles chez l'animal témoin et dans les vaisseaux collatéraux aux différents stades de développement.

L'estimation de l'activité est faite sur coupes semi-fines en microscopie optique et exprimée comme :
 - = nulle ; + = faible ; ++ = modérée ; +++ = forte.

Enzyme	Localisation	Témoin	3 semaines post-opératoires	8 - 12 semaines post-opératoires	1 - 2 ans post-opératoires
ATPase	intima	+++	++	+++	+++
	zone subintimale			-	++
	média	+++	-	+++	+++
ADPase	adventitia	+++	+	+++	+++
	intima	++	++	++	++
	zone subintimale			-	+
TPPase	média	++	-	++	++
	adventitia	+	+	+	+
	intima	+++	+++	+++	+++
AMPase	zone subintimale			-	+
	média	++	-	+++	++
	adventitia	+	+	+	+
AlPase	intima	-	-	-	-
	zone subintimale			-	-
	média	-	-	-	-
ACPase	adventitia	++	+++	++	++
	intima	-	-	-	-
	zone subintimale			+	++
G-6-Pase	média	+	+++	++	+
	adventitia	+	+++	+	+
	intima	+	+	++	+
	zone subintimale			++	++
	média	+	++	+	+
	adventitia	++	+++	++	++

polyphosphatasique. Par contre, les membranes plasmatiques des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses disposées circulairement ont gardé leur charge importante en polyphosphatase. Dans l'adventice, chaque cellule réagit de façon normale, à l'exception de quelques cellules mésenchymales qui montrent une activité plus élevée de la nucléoside diphosphatase dans le réticulum endoplasmique et dans l'enveloppe nucléaire. Très caractéristique pour cette période proliférative est l'augmentation considérable de l'activité ATPasique dans les mitochondries des cellules myocardiques. Cette réactivité élevée reste tout de même préférentiellement localisée aux alentours des artères collatérales. L'activité de l'ATPase dans les mitochondries aux zones normales peut être mise en évidence après des périodes d'incubation prolongées.

La distribution de l'ATPase et l'ADPase dans les jonctions collatérales des animaux sacrifiés 1 et 2 ans après le début du développement ressemble fort à celle des animaux non-traités (fig. 19). A quelques exceptions près, les cellules musculaires du type longitudinal situées dans la zone proliférative subintimale, montrent cette fois-ci une activité polyphosphatasique classique. L'activité ATPasique dans les mitochondries, les éléments latéraux des diades et triades et les lamelles subsarcolemnales du muscle cardiaque voisin des artères collatérales se comporte pourtant de la même façon qu'aux stades prolifératifs précoces (fig. 21). Il suffit d'incuber pendant très peu de temps pour obtenir un marquage bien détaillé des matrices mitochondriales.

A aucun moment de l'évolution, nous n'avons rencontré d'activité liée aux myofilaments du muscle lisse ou strié. En doublant le temps d'incubation dans les essais de l'ADPase, nous sommes parvenus également à mettre en évidence une activité faible dans les matrices mitochondriales des cellules myocardiques. Nous interprétons ce résultat comme preuve indirecte de l'action de la myokinase qui agit sur l'ADP en formant l'ATP et l'AMP : l'ATP formé est à son tour déphosphorilé par l'ATPase mitochondriale.

En conclusion, les modifications ATP- et ADPasiques que nous considérons comme importantes et typiques dans le contexte général de l'évolution des vaisseaux anastomosés sont les suivantes :

1. La disparition de l'activité sur les cellules médiales dans les zones lésées au stade de 3 semaines après initiation du développement.
2. L'absence d'activité dans la couche désordonnée des cellules qui forment la zone subintimale après 8 - 12 semaines.

3. Le réarrangement des cellules subintimales est accompagné d'une réapparition d'activité sur leurs membranes plasmatiques à un stade plus tardif.
4. La persistance et, à certains stades de développement, l'augmentation de l'activité au niveau de la couche endothéliale.
5. Le caractère focal de l'activation de l'ATPase mitochondriale et sarcoplasmique dans les cellules myocardiques.

Nous pouvons trouver entre notre système et les modèles de l'athérosclérose de l'artériitis, divers points communs dans le comportement enzymatique.

Une diète riche en cholestérol provoque chez le rat au niveau de l'aorte une diminution de l'ATPase dans les zones d'hyperplasie intimale qui ne montrent pas de sudanophilie (Lojda 1962, Higginbotham et al. 1963). Lojda a souligné l'importance de cette teneur diminuée en ATPase dans la pathogénèse de l'athérosclérose. Dans les vaisseaux hypertendus (Oka et Angrist 1965) l'activité ATPasique semble varier avec le degré d'altération artérielle. Si la paroi est sévèrement lésée l'activité est faible et inégale, par contre si elle est moins altérée le taux d'activité est assez normal.

La présence d'une forte activité polyphosphatasique dans les vésicules pino-cytaires et dans les jonctions intercellulaires endothéliales suggère que le transport de métabolites est augmenté au travers de l'endothélium des anastomoses en prolifération.

L'activation progressive de l'ATPase mitochondriale dans le myocarde aux stades de 8 semaines jusqu'à 2 ans peut être reliée à l'état hypermétabolique des cellules myocardiques qui voisinent un vaisseau prolifératif, ou bien à un démasquage de l'enzyme causé par une altération de la structure mitochondriale. En rapport avec ceci des études biochimiques (Ziegler et Linnane 1968) et histochimiques (Weinstein 1960) ont indiqué que les mitochondries doivent être endommagées jusqu'à un certain degré pour obtenir une activation optimale de l'ATPase.

2. La thiamine pyrophosphatase.

La réaction TPPasique présente dans la membrane plasmatique des cellules endothéliales et musculaires, suit assez bien les modifications observées dans les expériences de l'ATPase et de l'ADPase durant les divers stades évolutifs de la croissance vasculaire.

Au stade d'altérations précoces, la couche endothéliale montre une activité assez importante (fig. 24). L'image contraste fort avec l'absence totale de

réaction au niveau de la membrane plasmique et dans les vésicules pinocytaires des cellules musculaires plus ou moins lésées.

D'un autre côté, ces cellules ont une très forte charge en TPPase dans l'appareil de Golgi (fig. 24) et dans quelques corps du type multivésiculaire au sein du cytoplasme. Les fibroblastes et les cellules d'origine sanguine se trouvant dans la média altérée et dans l'adventice apicale, ne semblent pas posséder de l'activité TPPasique sauf dans l'appareil golgien. Plus distales dans l'adventice les cellules présentent l'activité normale.

La charge en TPPase, dans le segment de souche et le segment terminal et dans d'autres pièces apparemment non modifiées structuralement, est très comparable à celle d'animaux témoins.

Dans la période de développement à 8 - 12 semaines, l'activité forte est maintenue dans l'endothélium et seulement des traces d'activité sont découvertes à la périphérie des cellules qui occupent la zone subendothéliale ; le précipité apparaît très dispersé dans les espaces intercellulaires. D'autre part, de nouveaux sites d'activité sont rencontrés dans le cytoplasme de certaines cellules musculaires modifiées. A côté de l'activité habituelle dans l'appareil de Golgi, le produit de réaction est présent dans le réticulum endoplasmique et dans la membrane nucléaire (fig. 25). Les couches du muscle lisse circulaire et les cellules adventitielles montrent l'activité classique observée chez l'animal non-traité.

Une normalisation quasi complète est obtenue dans la plupart des sections examinées des chiens de 1 et 2 ans en expérimentation. Cependant, les quelques segments, qui présentent un épaississement important et mal organisé, ont gardé une charge en TPPase semblable à celle décrite pour le groupe 8 - 12 semaines.

Cette dernière observation implique à notre avis qu'il existe un rapport assez direct entre la modification morphologique et le comportement enzymatique cellulaire, indépendamment de la période après initiation du développement. En d'autres mots les vaisseaux collatéraux s'adaptent individuellement à leur nouvelle situation et diffèrent par leur apparence et leur contenu biochimique.

La conception de Freiman et Kaplan sur l'activité d'un polyphosphatase agissant au niveau de la membrane plasmique est renforcée par le comportement concomittant des réactions vis-à-vis de l'ATP, l'ADP et le TPP qui s'exprime dans la phase proliférative par une augmentation dans l'endothélium et une diminution ou même une perte totale dans la zone subintimale.

L'autre activité, celle dans le système réticulaire et dans l'enveloppe nucléaire est interprétée comme l'action nucléoside diphosphatasique, malgré

l'absence d'activité envers l'ADP.

Que les cellules musculaires modifiées aient acquis un fonctionnement différent des cellules musculaires lisses normales est très fortement suggéré par l'activation de la NDPase d'une part et leur perte en polyphosphatase d'autre part. La NDPase élevée reflète probablement la capacité de synthèse élevée de ces cellules. Il est connu que la NDPase joue un rôle important dans la synthèse des produits sécrétoires de nature polysaccharidique. Ceci est en accord avec l'observation dans l'épaississement intimal de matériel mucopolysaccharidique et élastique présent en abondance.

3. La phosphatase alcaline.

Cette enzyme non spécifique n'a qu'une importance minime dans l'étude du développement des vaisseaux anastomosés car son activité se localise hors de ces vaisseaux.

Seulement à la dernière période, c. -à-d. deux ans après l'initiation de la croissance vasculaire, nous avons retrouvé de l'AlPase dans le système collatéral, notamment dans les subbranches et les vasa vasorum des anastomoses, la membrane plasmatique, particulièrement aux jonctions intercellulaires, et les vésicules de pinocytose sont fortement positifs. De nouveau, ces observations ont porté exclusivement sur les subbranches de grandeur entre 8 et 25 microns de diamètre luminal (fig. 32). Les artérioles terminales rencontrées dans le myocarde environnant les vaisseaux anastomosés n'ont apparemment montré aucune modification quant à leur localisation et à leur intensité de réaction.

Même si la distribution de l'AlPase n'intéresse pas directement l'évolution des vaisseaux collatéraux, nous avons cependant effectué ces expériences comme contrôle des réactions sur substrats spécifiques pour la détection des activités enzymatiques spécifiques.

4. La phosphatase acide.

Les changements morphologiques qui apparaissent au stade précoce de l'évolution sont accompagnés d'une augmentation considérable de la phosphatase acide à chaque niveau de la paroi vasculaire. Le degré d'activité enzymatique semble être proportionnel au degré d'altération structural.

Les cellules endothéliales très actives possèdent un nombre important de

granules lysosomiaux et multivésiculaires, tous très chargés en ACPase.

Le marquage de l'appareil golgien souvent très étendu, n'est plus limité au saccule interne et à quelques vésicules comme observé dans les animaux témoins, mais est réparti dans plusieurs saccules et dans la plupart des vésicules golgiennes.

Une réaction très élevée est également observée dans les cellules musculaires de la média. Le précipité de phosphate de plomb est distribué dans des corps lysosomiaux très hétérogènes répartis au sein du cytoplasme (fig. 35). Le complexe golgien dilaté réagit comme celui des cellules endothéliales (fig. 34). Les cellules des zones de la média les plus sévèrement altérées montrent fréquemment des cytolysomes d'origine autophagique et hétérophagique, riches en activité ACPasique (fig. 36). Les leucocytes et les trombocytes, infiltrés dans la média présentent une charge en ACPase dans des petites vacuoles et tubules. L'activité dans les cellules, se trouvant dans un état nécrotique avancé, est distribuée uniformément dans le cytoplasme. Ceci peut être attribuée à une fuite de l'enzyme au travers des membranes des lysosomes endommagés.

L'activité la plus remarquable de la paroi vasculaire est retrouvée dans les fibroblastes et les macrophages situés dans l'adventice ou dans la média altérée. Ils contiennent un grand nombre de corps de dimension variable, remplis avec le précipité de phosphate de plomb (fig. 37). L'appareil golgien se colore également.

Dans la phase proliférative (8 - 12 semaines après opération), l'activité ACPasique est fortement diminuée comparée au stade antérieur. Les cellules endothéliales et le muscle circulaire ne présentent qu'un nombre limité de corps réactifs, de même que la plupart des cellules adventitielles. Cependant, certaines cellules mésenchymales contiennent encore des cytolysomes, positifs pour l'ACPase ; ils sont probablement les résidus des cellules nécrotiques, phagocytées pendant la période antérieure de réparation. Les cellules musculaires modifiées, qui occupent la zone subendothéliale présentent un nombre assez important de corps lysosomiaux, chargés avec le produit de réaction (fig. 38).

Une diminution de l'activité ACPase est démontrée aux stades ultérieurs (1 et 2 ans de développement). L'image de la distribution enzymatique trouvée à ces moments est très comparable à celle trouvée dans les artères d'animaux non-traités. Nous n'avons pas noté des variations remarquables dans le comportement enzymatique au niveau des vaisseaux sanguins non prolifératifs, examinés au divers stades.

Par contre, nous avons remarqué des changements drastiques au niveau des cellules myocardiques situées à proximité d'un vaisseau collatéral pendant la

période expérimentale précoce. Une accumulation de structures lysosomiales secondaires, réactives pour l'ACPase est observée dans les cellules myocardiques dégénérées.

Des observations semblables ont été faites par certains auteurs en employant des modèles expérimentaux différents. Oka et Angrist (1965) ont observé l'apparition d'agrégats réactifs pour l'ACPase, dans certaines zones de la paroi vasculaire, des vaisseaux subissant une hypertension chronique. Une diète riche en cholestérol augmente l'ACPase dans l'aorte du rat (Hess et Staubli 1963). Cette activité élevée dans les cellules endothéliales, dilatées pendant la phase précoce de leur expérience, est suivie par un déclin très important dans la phase tardive. Une augmentation très remarquée des enzymes lysosomiales est démontrée par Miller et al. (1966) et par Miller et Kothari (1969) dans l'aorte athérosclérotique chez l'homme, l'activité enzymatique étant proportionnelle à l'intensité de l'athérosclérose. Des observations similaires ont été décrites par Branwood et Carr (1960) dans l'intima des artères coronaires athérosclérotiques.

Bien qu'on ne puisse pas relier de façon directe le modèle d'occlusion graduelle que nous avons employé aux modèles expérimentaux de l'athérosclérose et de l'hypertension, certaines phases semblent évoluer dans la même direction, notamment le processus lytique suivi par l'apparition d'une prolifération intinale. L'activité ACPasique suit de très près les changements morphologiques dans tous les modèles : une augmentation aiguë aux stades précoces, qui est proportionnelle au degré de la lésion, est suivie par une diminution dans les stades évolutifs ultérieurs.

L'augmentation de l'activité enzymatique peut être expliquée de deux manières :

1. Lorsque les organites, possédant de l'activité ACPasique apparaissent en plus grand nombre dans les vaisseaux anastomosés que dans les artères coronaires normales de calibre comparable, on pourrait admettre qu'une synthèse accélérée a lieu dans la paroi collatérale.
2. Il est possible qu'il s'agit d'une activation d'enzymes existantes, mais sous forme masquée.

La présence d'activité élevée dans l'appareil golgien, pendant la période de lésion, suggère que cet organite participe activement dans la formation des lysosomes, comme indiqué dans les multiples travaux de Novikoff. En plus, il semble probable qu'aussi bien les activités golgiennes que lysosomiales jouent un rôle inductif dans la formation des cytolysosomes. La proposition de de Duve et Wattiaux (1966) "Lysosomes are important in cellular pathology because they are almost

invariably involved in the response of the organism to the challenging agent" paraît bien confirmée dans cette étude, "the challenging agent" étant ici d'origine hémodynamique.

5. La 5'-nucléotidase

Les mêmes sites d'activité que pour les artères d'animaux témoins sont retrouvés pour cette enzyme dans le groupe d'animaux à 3 semaines, il y a pourtant une nette différence en intensité de réaction. Les membranes plasmiques des nombreux fibroblastes et fibrocytes, dans l'adventice des vaisseaux collatéraux sont toutes marquées après une incubation de courte durée (5 min. à 37° C). D'autre part, les cellules d'origine sanguine infiltrées dans cette zone sont indemnes de précipité. La même teneur en activité enzymatique est notée dans les cellules mésenchymales autour des petits vaisseaux myocardiques (fig. 28/29).

Dans les groupes d'animaux à 8 - 12 semaines et à 1 - 2 ans l'activité 5'-nucléotidasique diminue de nouveau et atteint plus ou moins l'intensité trouvée chez les animaux normaux. Les rares fibroblastes et fibrocytes localisés dans la zone proliférative, réagissent comme ceux de l'adventice. Ni les cellules endothéliales, ni les cellules musculaires lisses, ni le muscle strié ne montrent la moindre activité.

En investigant les artères carotides chez les bovidés, Moreau-Collinet (1964) suggère que l'endothélium et les cellules musculaires lisses ne contiennent pas de 5'-nucléotidase. Higginbotham et Higginbotham (1967) en employant des techniques histochimiques, n'ont pas retrouvé d'activité dans l'aorte de chien. Des observations similaires ont été décrites par Oka et Angrist (1965) dans les artères coronaires de rats normaux, par contre, ils ont observé l'apparition focale d'une AMPase dans les parois artérielles des rats qui sont sévèrement hypertendus et qui montrent une artériiitis segmentale nette.

Dans notre cas, l'augmentation de l'activité, dans les adventices des segments très altérés, pourrait indiquer la réaction du tissu conjonctif, reflétant l'initiation de la phase de réparation. Notre hypothèse sur la fonction possible des cellules périvasculaires dans l'autorégulation du courant sanguin semble être renforcée par la présence en abondance de la 5'-nucléotidase sur les membranes plasmiques des cellules mésenchymales situées dans une zone d'hypoxie myocardique.

6. La glucose-6-phosphatase.

La distribution uniforme de la G-6-Pase comme présente dans chaque cellule de la paroi des vaisseaux normaux a subi des modifications assez frappantes dans les vaisseaux collatéraux au stade de 3 semaines. Les cellules endothéliales dilatées rencontrées dans les segments médians montrent une perte significative ; cette perte semble de nouveau en rapport direct avec le degré d'altération morphologique. Les quelques cellules endothéliales en état de nécrose totale ont perdu complètement l'activité au niveau du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire. Par contre, dans la média, les cellules musculaires (à contenu élevé en structures réticulaires), les leucocytes et thrombocytes infiltrés sont très intensément colorés pour la G-6-Pase (fig. 42). Pourtant, nous avons noté la charge la plus forte dans les nombreux fibroblastes adventitiels, remplis de longs profils de réticulum endoplasmique. Les zones moins lésées et les segments de souche et d'entrée n'ont apparemment pas modifié leur contenu en G-6-Pase.

Quelques cellules myocardiques, à proximité d'une anastomose, montrant des changements dégénératifs comme l'apparition de cytolysomes et de globules de graisse, sont complètement déprivées de produit de réaction (fig. 43). Le réticulum sarcoplasmique d'autres cellules voisines, apparemment en meilleur état, est bien coloré.

Une forte activité est de nouveau présente dans les cellules endothéliales des vaisseaux collatéraux en phase proliférative à 8 - 12 semaines. Une augmentation de l'activité est également constatée au niveau des multiples profils réticulaires présents dans les cellules musculaires modifiées et dans les fibroblastes de l'apaisissement intimal (fig. 44).

Dans la média et dans l'adventice on a rencontré une activité normale, de même que dans le myocarde à ce moment. Une tendance à se normaliser davantage est observée dans les différentes couches vasculaires et dans le myocarde (fig. 45) aux stades tardifs de l'évolution. Les investigations qui portent sur la distribution de la G-6-Pase dans la pathologie vasculaire sont assez rares. Dans les fibres musculaires de l'aorte de lapins normaux et de ceux nourris au cholestérol (Fouquet 1961) l'activité de la G-6-Pase est très faible. Les sites d'activité de la G-6-Pase dans les artères périphériques humaines sont identiques à ceux de la phosphatase alcaline, notamment la zone interne de l'adventice. Les plaques artériosclérotiques sont riches en G-6-Pase (Stein et Harris 1964). La paroi musculaire des veines humaines normales semble ne pas posséder d'activité,

de même que les veines phlébosclérotiques (Stein et al. 1964).

Kobernick et Hashimoto (1963) dans leurs expériences sur l'aorte de lapin, ont observé que l'aorte normale et l'aorte après induction de la lésion athéromateuse ne possèdent pas d'activité envers le G-6-P. Par contre, les zones caractérisées par une lésion spontanée, accompagnée d'une nécrose de cellules musculaires de la média interne, montrent une activité G-6-Pasique très importante. Ces auteurs donnent l'explication suivante aux changements morphologiques et au comportement concomitant de l'activité enzymatique : l'activité G-6-Pasique est une indication de production active de glucose ; les cellules de l'aorte et de la plupart des vaisseaux ne possèdent pas cette fonction, mais sont plutôt impliquées dans le catabolisme du glucose pour les besoins énergiques. Si le glucose est produit dans la paroi vasculaire, il reste moins de glucose-6-phosphate disponible aux cycles qui produisent de l'énergie et ceci pourrait être un facteur important dans la pathogénèse de la dégénération cellulaire. L'activité augmentée de G-6-Pase dans les cellules musculaires modifiées de la zone subendothéliale peut refléter l'habilité que ces cellules ont acquis de synthétiser des mucopolysaccharides de l'élastin et de la collagène, lesquels sont sécrétés en abondance.

RESUME

Dans le cadre de la recherche sur les causes et le traitement de l'ischémie cardiaque, Schaper et collaborateurs se sont fort intéressés à la circulation coronarienne par voie collatérale. Ces auteurs ont observé que la croissance du tissu artériel chez l'animal adulte est initiée par l'occlusion graduelle d'une des artères principales. La méthode expérimentale employée consiste à placer un constricteur amérolde autour de l'artère circonflexe. L'amérolde resserre lentement la lumière artérielle et finalement provoque l'occlusion totale 2 - 3 semaines après implantation. Un grand nombre d'animaux survivent ce traitement sans infarctus myocardique, en d'autres mots, ils ont été capables de rétablir une circulation par voie collatérale suffisante pour remplacer la circulation coronarienne normale.

Le développement des anastomoses interartérielles, de nombre variable chez chaque animal, évolue selon des phases bien définies.

Le but de notre recherche fut de déterminer les modifications morphologiques au niveau ultrastructural qui s'accomplissent dans la paroi des vaisseaux collatéraux pendant les phases les plus caractéristiques du développement et qui résultent dans la transformation de petites artérioles en artères fonctionnelles de calibre moyen.

En parallèle avec cette étude morphologique, la distribution enzymatique de certaines phosphatases a été établie dans le système coronaire et le myocarde du chien normal, de même que le comportement de ces enzymes hydrolytiques pendant le développement des vaisseaux anastomosés.

1 re partie

La morphologie des vaisseaux collatéraux coronaires en développement.

1. Les anastomoses interartérielles dans le cœur du chien normal. Le détail ultrastructural des différentes couches qui forment la paroi artériolaire est brièvement rappelé.
2. Les altérations de la paroi vasculaire au stade précoce. Quelques jours après l'occlusion complète de l'artère circonflexe, les jonctions interartérielles connectant l'artère antérieure descendante avec l'artère circonflexe, ont un aspect dilaté, qui est le plus prononcé au niveau des segments vasculaires à paroi mince, notamment les segments situés au milieu de la jonction interartérielle.

Au point de vue morphologique, nous avons constaté que :

- a. La paroi vasculaire montre une grande variété d'altérations qui vont de modifications dégénératives de certains organites cytoplasmiques jusqu'à la nécrose cellulaire complète.
- b. Il est possible de classifier ces altérations topographiquement, le degré de la lésion étant le plus sévère à l'endroit où la paroi musculaire est très mince. Il nous paraît évident que ces endroits sont les plus exposés aux changements hémodynamiques.
- c. La paroi vasculaire apparaît rupturée à certains sites dans les zones les plus endommagées. Une invasion énorme de cellules d'origine sanguine et de protéines plasmatiques est notée à proximité de ces discontinuités dans la couche endothéliale.
- d. Des signes caractéristiques de réparation sont présents : immigration de leucocytes dans les zones lésées, abondance des macrophages dans l'adventice, et activité mitotique des cellules mésenchymales dans les zones qui environnent une plage sévèrement lésée.

3. La phase proliférative : 8 - 12 semaines après implantation.

L'apparence morphologique du système collatéral a fort évolué entre la 3^{me} et la 8^{me} semaine post-opératoire. La paroi vasculaire est épaissie considérablement, suite à l'activité mitotique à 3 semaines, celle-ci étant initiée par les lésions qui sont observées aux stades précoces. L'aspect dominant à ce stade de la croissance est le développement d'une couche cellulaire située entre l'endothélium et la lamelle élastique.

Cette prolifération intimale est la plus prononcée dans le segment vasculaire topographiquement situé au même endroit que celui qui montrait les altérations les plus sévères antérieurement.

Nous avons distingué quatre types cellulaires dans cette zone : des cellules musculaires lisses normales, des cellules musculaires modifiées, des fibroblastes et des leucocytes du type monocytaire et polymorphonucléaire. L'organisation de ces cellules entre-elles apparaît très fortuite. L'origine de ces divers types cellulaires et leur fonction possible sont discutés.

4. Les stades tardifs du développement : 1 - 2 ans après l'initiation de la croissance.

Les vaisseaux collatéraux ont atteint des dimensions artérielles : le diamètre luminal moyen pris au milieu de l'artère collatérale étant de 1 mm. On a observé un rétrécissement de la zone proliférative subintimale et même sa disparition totale dans certains vaisseaux.

La majorité des cellules dans cette couche sont des cellules musculaires, orientées de façon longitudinale ou hélicoïdale par rapport à l'axe du vaisseau. Très significatif pour l'évolution vers un stade définitif est le réarrangement de ces cellules en couches bien définies.

De plus, la présence de matériel élastique en plaquettes très denses et de nombreuses fibres de collagène dans les espaces intercellulaires suggère fort les besoins de la paroi collatérale en matériel très résistant pour réagir de manière adéquate aux influences hémodynamiques et aux forces mécaniques, induites par le muscle cardiaque pendant la systole et la diastole.

La signification de la couche subendothéliale persistant dans les segments de la zone médiane est discutée.

2^{me} partie

La cytochimie des hydrolases phosphatasiques dans les vaisseaux coronaires normaux et dans les vaisseaux anastomosés aux stades divers de développement.

Le but principal de ces essais cytochimiques fut d'obtenir des informations d'ordre qualitatif et dans la mesure du possible d'ordre quantitatif concernant la distribution de certaines activités phosphatasiques associées avec des organites cellulaires importants tels que la membrane plasmatique et les vésicules de pinocytose (l'ATPase, l'ADPase, l'AMPase, la TPPase et l'AlPase) ; le réticulum endoplasmatique et l'enveloppe nucléaire (la NDPase et la G-6-Pase), les mitochondries (l'adénosine-triphosphatase) ; l'appareil de Golgi (la TPPase et l'ACPase) ; les lysosomes (l'ACPase).

1. Après avoir passé en revue, la méthodologie cytochimique pour la détection des activités phosphatasiques et présenté une évaluation critique de l'interprétation des résultats obtenus en cytochimie, nous avons consacré une partie de ce mémoire à la localisation des enzymes dans le cœur des chiens normaux. Les observations les plus caractéristiques sont :

- a. L'existence d'une polyphosphatase au niveau de la membrane plasmatique des cellules endothéliales, musculaires et mésenchymales des artères, artérioles et veines coronaires, hydrolysant l'ATP, l'ADP et le TPP.
- b. La présence d'une phosphatase alcaline exclusivement dans l'endothélium des vaisseaux de résistance.
- c. La faible teneur de presque chaque cellule en phosphatase acide.
- d. L'habilité propre aux cellules mésenchymales périvasculaires d'hydrolyser l'AMP, l'IMP et l'UMP par l'action d'une 5'-nucléotidase.

- e. L'action d'au moins trois enzymes différentes envers le substrat TPP.
- f. Le marquage uniforme du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire de chaque type cellulaire par la glucose-6-phosphatase.

Les rôles physiologiques connus ou hypothétiques des différentes activités phosphatasiques sont discutés.

2. La distribution des phosphatases dans les vaisseaux collatéraux en développement.

- a. Les modifications dans le comportement enzymatique observées au stade précoce vont de pair en général avec les altérations morphologiques. Nous avons entre autres observé :
 - une diminution de l'activité polyphosphatasique au niveau de la membrane plasmatique des cellules musculaires lisses, dans les cas de lésions sévères ces cellules ont perdu totalement cette activité.
 - une disparition locale de l'activité ATPasique dans la matrice mitochondriale des cellules myocardiques altérées, localisées à proximité d'une anastomose en développement.
 - une charge importante en ACPase dans les corps lysosomiaux et les cytolysomes, abondamment présents dans le cytoplasme des cellules altérées.
 - une distribution inégale de l'activité G-6-Pasique : diminution dans les cellules endothéliales lésées ; augmentation dans les cellules de la média et de l'adventice et perte quasi complète au niveau des cellules myocardiques lésées.
 - une augmentation considérable de l'activité 5'-nucléotidasique dans les cellules mésenchymales périvasculaires.
- b. Les modifications des activités enzymatiques pendant les phases prolifératives :
 - Les changements de l'activité polyphosphatasique se situent surtout dans l'épaississement subendothélial où aucune des cellules présentes ne montre de réaction.
 - Par contre, les cellules musculaires modifiées de cette zone ont acquis une activité nucléoside-diphosphatasique qui est située dans le réticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire.
 - Les mitochondries des cellules myocardiques entourant un vaisseau en prolifération, possèdent une charge en ATPase très élevée. Ce phénomène semble être très focal.

- Une forte réaction TPPasique est notée dans la couche endothéliale à ce stade.
 - L'activité de l'ACPase est fortement diminuée par rapport au stade antérieur. Quelques cellules mésenchymales possèdent encore des phagosomes (résidus de cellules nécrotiques) positifs pour l'ACPase.
 - Quelques cellules fibroblastiques se trouvant dans la zone subendothéliale ont une activité 5'-nucléotidasique.
 - L'activité envers le G-6-P est généralement augmentée dans l'endothélium et la couche subintimale.
 - A aucun moment de l'évolution, nous n'avons rencontré une activité de la phosphatase alcaline dans les vaisseaux anastomosés.
- c. Les activités enzymatiques pendant la phase tardive de l'évolution.

Les activités enzymatiques ont tendance à se normaliser après un et deux ans de développement. Ceci est notamment le cas pour l'ACPase lysosomiale et golgienne, la 5'-nucléotidase à la surface des cellules périvasculaires, la polyphosphatase au niveau de la membrane plasmatique, la TPPase golgienne et la G-6-Pase dans le système réticulaire. Une exception bien caractéristique est trouvée dans les mitochondries des cellules myocardiques qui ont gardé leur teneur très élevée en activité ATPasique.

En conclusion, il semble exister une corrélation très nette entre les modifications morphologiques des différentes couches cellulaires formant la paroi vasculaire des vaisseaux collatéraux et le comportement de leur équipement enzymatique.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, C.W.M. :

Histochemistry of normal cardiovascular tissue. In : Vascular Histochemistry, p.4, ed. by C.W.M. Adams, Publ. Lloyd-Luke Ltd., London (1967).

Ahmed, M. :

The fine structure of endothelium in coronary arterioles.

Acta anat. 69, 327 (1968).

Ahmed, Z. and Reis, J. :

The activation and inhibition of 5'-nucleotidase.

Biochemical Journal 69, 386 (1958).

Allen, J. :

The properties of Golgi-associated nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase. I. Cytochemical analysis.

J. Histochem. Cytochem. 11, 529 (1963).

Barka, T. and Anderson, P. :

Histochemical methods for acid phosphatase using hexasonium pararosanilin as coupler.

J. Histochem. Cytochem. 10, 741 (1962).

Berman, J., Fields, D., Judy, H., Mori, V. and Parker, R. :

Gradual vascular occlusion.

Surgery 39, 399 (1956).

Berne, R. :

Cardiac nucleotides in hypoxia : Possible role in regulation of coronary blood flow.

Amer. J. Phys. 204, 317 (1963).

Björkerud, S. :

Reaction of the aortic wall of the rabbit after superficial longitudinal, mechanical trauma.

Virch. Arch. Abt. A. Pathol. Anat. 347, 197 (1969).

Blinzinger, K., Simon, J., Magrath, D. and Boulger, L. :

Elektronenmikroskopische Beobachtungen bei experimenteller Poliomyelitis.

Experientia 24/11, 1095 (1968).

Borgers, M., Schaper, J. and Schaper, W. :

Acute vascular lesions in developing coronary collaterals.

Virchow's Archiv. Abt. A Pathol. Anat. 351, 1 (1970).

Borgers, M. et al. :

Adenosine producing sites in the mammalian heart. A cytochemical study.

(soumis à la publication).

Brady, R. and Tower, D. :

The neurochemistry of nucleotidase and amino acids.

Publ. New York, John Wiley and Sons (1960).

Branwood, A. and Carr, A. :

B-glucoronidase activity of coronary atherosclerotic plaques.

Lancet 2, 1254 (1960).

Buck, R. :

The fine structure of the aortic endothelial lesions in experimental cholesterol atherosclerosis of rabbits.

Amer. J. Path. 34, 897 (1958).

Buck, R.C. :

Intimal thickening after ligation of arteries. An electron microscopic study.

Circ. Res. 9, 418 (1961).

Burger, R. and Lowenstein, J. :

Adenylate deaminase. III. Regulation of deamination pathways in extracts of rat heart and lung.

J. of Biol. Chem. 242, 5281 (1967).

Cori, G., Gerty, T., Cori, C. and Schmidt, G. :

The role of glucose-1-phosphate in the formation of blood sugar and synthesis of glycogen in the liver.

J. Biol. Chem. 129 (1939).

Cotran, R. and Remensnyder, J. :

The structural basis of increased vascular permeability after graded thermal injury. Light and electron microscopic studies.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 150, 495 (1968).

Daems, W., Wisse, E. and Bredero, P. :

Electron microscopy of the vacuolar apparatus. In "Lysosomes in biology and pathology", I, 3, p. 64. Ed. Dingle J. and Fell, H. (1969) North-Holland Publ., Amsterdam-London.

Dauwalder, M., Whaley, W. and Kephart, J. :

Phosphatases and differentiation of the Golgi apparatus.
J. Cell Sci. 4, 455 (1969).

Duve, C. de, Pressman, B., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. :

Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue.
Biochem. J. 60, 604 (1955).

Duve, C. de, and Wattiaux, R. :

Functions of lysosomes.
Ann. Rev. Physiol. 28, 435 (1966).

Ericsson, J. :

On the fine structural demonstration of glucose-6-phosphatase.
J. Histochem. Cytochem. 14, 361 (1966).

Ericsson, J. :

Mechanism of cellular autophagy.
Vol. 2, Ch. 2, p. 345. In "Lysosomes in biology and pathology" ed. Dingle, J. and Fell, H. (1969) North-Holland Publ. Amsterdam-London.

Essner, E., Novikoff, A. and Masek, B. :

Adenosinetriphosphatase and 5'-nucleotidase activities in the plasma membrane of liver cells as revealed by electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cyt. 4, 711 (1958).

Essner, E., Fogh, J. and Fabrizio, P. :

Localization of mitochondrial ATPase activity in cultured human cells.
J. Histochem. Cytochem. 13, 8, 647 (1965).

Esterly, J.A., Glagov, S. and Ferguson, D.J. :

Morphogenesis of intimal obliterative hyperplasia of small arteries in experimental pulmonary hypertension.
Ann. J. Pathol. 52, 325 (1968).

Fahimi, D. et Drochmans, P. :

Essais de standardisation de la fixation au glutaraldehyde. Purification et détermination de la concentration du glutaraldehyde.

J. Microsc. 4, 725 (1965).

Ferrans, V., Hibbs, R. and Buja, L. :

Nucleoside phosphatase activity in atrial and ventricular myocardium of the rat : A light and electron microscopic study.

Amer. J. Anat. 125, 47 (1969).

Fouquet, J. :

Dépôt expérimental de cholestérol dans l'aorte du lapin, modifications histoenzymologiques corrélatives.

Ann. Histochim. 6, 153 (1961).

Freiman, D. and Kaplan, N. :

Studies on the histochemical differentiation of enzymes hydrolyzing ATP.

J. Histochem. Cytochem. 8, 159 (1960).

Fuchs, A. und Weibel, E. :

Morphometrische Untersuchung der Verteilung einer spezifischen cytoplasmatischen Organelle in Endothelzellen der Ratte.

Z. Zellforsch. 73, 1 (1966).

Ganote, Ch., Rosenthal, A., Moses, H. and Tice, L. :

Lead and phosphatase as sources of artifact in nucleoside phosphatase histochemistry.

J. Histochem. Cytochem. 17, 10, 641 (1969).

Gardner, D. and Laing, C. :

Measurement of enzyme activity of isolated small arteries in early rat hypertension.

J. Path. Bact. 90, 399 (1965).

Goldfischer, S., Essner, E. and Novikoff, A. :

The localization of phosphatase activities at the level of ultrastructure.

J. Histochem. Cytochem. 12, 72 (1964).

Gömöri, G. :

Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections.

Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 42, 23 (1939).

Gömöri, G. :

Microscopic histochemistry. Chicago : Chicago University Press (1958).

Arch. Path. 32, 189 (1941).

Graf, B., Faure, J-P., De Kozak, Y et Pouliquen, Y. :

Activité des fibroblastes dans la résorption du collagène au cours d'une réaction inflammatoire de la cornée du lapin. Etude ultrastructurale.

Arch. Anat. Microsc. 59, 3, 171 (1970).

Grossmann, W. and Heitkamp, D. :

Electron microscopic localization of mitochondrial ATPase activity.

J. Histochem. Cytochem. 16, 645 (1968).

Hackensellner, H.A., David, H. und Uerlings, I. :

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an doppelt ligierten Arterien (A. carotis des Kaninchen).

Acta Biol. Med. Germ. 14, 34 (1965).

Hardonk, M. and Koudstaal, J. :

5'-nucleotidase. II. The significance of 5'-nucleotidase in the metabolism of nucleotides studies by histochemical and biochemical methods.

Histochem. 12, 18 (1968).

Hasselbach, W. :

Relaxation and the sarcotubular calcium pump.

Fed. Proc. 23, 909 (1964).

Hatt, P.Y. et Dontcheff, A. :

Contribution de la microscopie électronique à l'étude du mécanisme de l'hypertension artérielle expérimentale d'origine rénale chez le rat.

Arch. Malad. Cœur 52, 490 (1959).

Hatt, P.Y., Percheron, F., Allaire, Y., Kernec, H., Lafon, Y. et Roques, B. :

Contribution de la microscopie électronique à l'étude du mécanisme de l'hypertension artérielle expérimentale d'origine rénale. III. Le rein dans la surcharge en désoxycorticostérone chez le rat.

Path. Biol. 11, 417 (1963).

Hatt, P.Y., Dvopakovic, M. et Cornet, P. :

Contribution de la microscopie électronique à l'étude du mécanisme de l'hypertension artérielle expérimentale d'origine rénale. II. L'ischémie rénale chez le lapin.

Path. Biol. 10, 23 (1962).

Haussler, M., Nagode, L. and Rasmussen, H. :

Induction of intestinal brush border alkaline phosphatase by Vitamin D and identity with Ca-ATPase.

Nature 228, 1199 (1970).

Haust, M.D., More, R.H. and Movat, H.Z. :

The role of smooth muscle cells in the fibrogenesis of arteriosclerosis.

Am. J. Pathol. 37, 377 (1960).

Haust, M.D., More, R.H. and Balis, J.M. :

Electron microscopic study of intimal lipid accumulations in the human aorta and their pathogenesis.

Circulation 26, 656 (1962).

Haust, M.D., More, R.H., Bencosme, S.F. and Balis, J.M. :

Elastogenesis in human aorta. An electron microscopic study.

Exp. Mol. Pathol. 4, 508 (1965).

Herman, R. and Padykula, H. :

The effects of mercurials and cysteine on acid phosphatase and glucose-6-phosphatase.

J. Histochem. Cytochem. 4, 443 (1956).

Hess, R. and Staubli, W. :

The development of aortic lipidosiis in the rat. A correlative histochemical electron microscopic study.

Amer. J. Path. 43, 301 (1963).

Higginbotham, F., Sandler, M., Higginbotham, A. and Bourne, G. :

Observations on some histochemically demonstrable enzyme activities in non-arteriosclerotic beagle aorta.

Circ. 28, 659 (1963).

Higginbotham, F. and Higginbotham, A. :

Histochemical study of beagle aorta.

J. Atheroscler. Res. 7, 89 (1967).

Hoff, H. :

A comparison of the fine structural localization of nucleoside phosphatase activity in large intracranial blood vessels and the thoracic aorta of rabbits.

Histochem. 13, 183 (1968).

Hoff, H. and Graf, J. :

An electron microscopic study of phosphatase activity in the endothelial cells of rabbit aorta.

J. Histochem. Cytochem. 14, 719 (1966).

Hoff, H.F. and Gottlob, R. :

A fine structure study of injury to the endothelial cells of the rabbit abdominal aorta by various stimuli.

Angiology 18, 440 (1967).

Hoff, H.F. and Gottlob, R. :

Ultrastructural changes of large rabbit blood vessels following mild mechanical trauma.

Virch. Arch. Abt. A Pathol. Anat. 345, 93 (1968).

Hugon, J. and Borgers, M. :

A direct lead method for the electron microscopic visualization of alkaline phosphatase activity.

J. Histochem. Cytochem. 14, 5, 429 (1966 a).

Hugon, J. and Borgers, M. :

Ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the absorbing cells of the duodenum of mouse.

J. Histochem. Cytochem. 14, 9, 629 (1966 b).

Hugon, J. et Borgers, M. :

Corrélation entre la fixation de la muqueuse intestinale et la mise en évidence cytochimique de la phosphatase alcaline.

J. Microsc. 8, 60 a (1969 a).

Hugon, J. et Borgers, M. :

Localisation de l'activité de la thiamine pyrophosphatase et de la glucose-6-phosphatase des cellules absorbantes de la muqueuse intestinale.

J. Microsc. 8, 61 a (1969 a).

Hugon, J., Borgers, M. and Maestracci, D. :

Glucose-6-phosphatase and thiamine pyrophosphatase activities in the jejunal epithelium of the mouse.

J. Histochem. Cytochem. 18, 5, 361 (1970).

Katori, M.D. and Berne, R. :

Release of adenosine from anoxic heart. Relationship to coronary flow.
Circ. Res. 19, 420 (1966).

Knieriem, H.J. :

Electronmicroscopic study of bovine arteriosclerotic lesions.
Am. J. Pathol. 50, 1035 (1967).

Kobernick, S. and Hashimoto, Y. :

Histochemistry of atherosclerosis. II. Spontaneous degenerative lesions of aorta
of exercised and sedentary rabbits.
Lab. Invest. 12, 685 (1963).

Kubler, W. :

Tierexperimentelle Untersuchungen zum Myocardstoffwechsel im Angina-Pectoris-
Anfall und beim Herzinfarkt. In Bibliotheca Cardiologica N° 2 (Basel - Schweiz).
New York : S. Karger (1969).

Lemeunier, A., Burri, P. and Weibel, E. :

Absence of acid phosphatase activity in specific endothelial organelles.
Histochemie 20, 143 (1969).

Liebow, A.A. :

Arteriosclerosis of the pulmonary circulation.
In : Cowdry's arteriosclerosis. Chapt. 14, p. 248. Ed. : H.T. Blumenthal.
Springfield, Illinois. Publ. C.C. Thomas (1967).

Linder, E. :

Studies on coronary collateral blood flow in dogs by Krypton⁸⁵ and Xenon¹³³
clearance.
Thesis, University Göteborg (1966).

Litvak, J., Siderides, L.E., Vineberg, A.M. :

The experimental production of coronary artery insufficiency and occlusion.
Amer. Heart J. 53, 505 (1957).

Lochner, W. und Hirche, H. :

Untersuchung über die stimulierende Wirkung einiger Substanzen auf die Chemo-
rezeptoren der sinus caroticus und über die erweiternde Wirkung auf die Coronar-
gefäße.
Naturwissenschaften 11, 259 (1962).

Lojda, Z. :

The enzyme topochemistry of the arterial wall.

Cs. Morfol. 10, 46 (1962).

Longland, C.J. :

The collateral circulation of the limb.

Ann. Roy. Coll. Surg. Engl., 13, 161 (1953).

Luft, J. :

Improvements in epoxy resin embedding methods.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409 (1961).

Majno, G., Shea, S.M. and Leventhal, M. :

Endothelial contraction induced by histamine-type mediators. An electron microscopic study.

J. Cell Biol. 42, 647 (1969).

Marchesi, V. and Barnett, R. :

The demonstration of enzymatic activity in pinocytic vesicles of blood capillaries with the electron microscope.

J. Cell Biol. 17, 547 (1963).

Mietkiewski, K., Domka, F., Malendowics, L. and Malendowics, J. :

Studies on ATP hydrolysis in medium for histochemical demonstration of ATPase activity.

Histochemie 24, 343 (1970).

Miller, B., Aiba, T., Keyes, F., Curreri, P. and Branwood, A. :

Beta-glucuronidase activity and its variation with pH in human atherosclerotic arteries.

J. Atheroscler. Res. 6, 352 (1966).

Miller, B. and Kothari, H. :

Increased activity of lysosomal enzymes in human atherosclerotic aortas.

Exptl. Mol. Pathol. 10, 3, 288 (1969).

Moore, D. and Ruska, H. :

The fine structure of capillaries and small arteries.

J. Biophys. Cytol. 3, 457 (1957).

Moreau-Collinet, C. :

L'activité 5'-nucléotidasique de l'adventice de carotides de bovidés.
Angiologica 1, 36 (1964).

Moses, H., Rosenthal, A., Beaver, D., Schuffman, S. :

Lead ion and phosphatase histochemistry. II. Effect of ATP hydrolysis by lead ion on the histochemical localization of ATPase activity.

J. Histochem. Cytochem. 14, 702 (1966).

Moses, H., Rosenthal, A. :

On the significance of lead-catalyzed hydrolysis of nucleoside phosphatases in histochemical systems.

J. Histochem. Cytochem. 15, 354 (1967).

Moses, H. and Rosenthal, A. :

Pitfalls in the use of lead ion for histochemical localization of nucleoside phosphatases.

J. Histochem. and Cytochem. 16, 8, 530 (1968).

Newman, W., Feigin, I., Wolf, A. and Kabat, E. :

Histochemical studies on tissue enzymes. IV. Distribution of some enzyme systems which liberate phosphate at pH 9.2 as determined with various substrates and inhibitors ; demonstration of three groups of enzymes.

Amer. J. of Path. 26, 257 (1950).

Novikoff, A. :

Lysosomes in the physiology and pathology of cells. Ciba Foundation Symposium Lysosomes. J.A. Churchill ed. London 36 (1963).

Novikoff, A. :

Enzyme localization with Wachstein-Meisel procedures : real or artifact.

J. Histochem. Cytochem. 15, 353 (1967).

Novikoff, A. :

Enzyme localizations with Gömöri type lead phosphate Procedures : real or artifact.

J. Histochem. Cytochem. 18, 366 (1970).

Novikoff, A. :

Their phosphatase controversy : Love's labours lost.

J. Histochem. Cytochem. 18, 916 (1970).

Novikoff, A. and Goldfischer, S. :

Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 47, 802 (1961).

Novikoff, A., Essner, E., Goldfischer, S. and Heus, M. :

Nucleosidephosphatase activities of cytomembranes.

In "The interpretation of ultrastructure". Ed. Harris R.J.C. New York and London. Academic Press 1, 149 (1962).

Oka, M. and Angrist, A. :

Histoenzymatic studies of arteries in high salt hypertension.

Lab. Invest. 14, 1604 (1965).

Parker, F., Odland, G.F. :

(a) A correlative histochemical, biochemical and electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rabbit aorta with special reference to the myo-intimal cell.

Am. J. Pathol. 48, 197 (1966).

Pease, D.C. and Molinari, S. :

Electron microscopy of muscular arteries ; Pial vessels of the cat and monkey. J. Ultrastructure Res. 3, 447 (1960).

Pease, D.C. and Paule, W.J. :

Electron Microscopy of elastic arteries ; the thoracic aorta of the rat. J. Ultrastructure Research 3, 469 (1960).

Pool, P., Covell, J., Chidsey, Ch. and Braunwald, E. :

Myocardial high energy phosphate stores in acutely induced hypoxic heart failure. Circ. Res. 19, 221 (1966).

Reynolds, E. :

The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.

J. Cell. Biol. 17, 208 (1963).

Rhodin, J. :

Fine structure of vascular walls in mammals with special reference to smooth muscle components.

Physiol. Rev. 42 (suppl. 5) 48 (1962).

Robertson, H.R., Moore, J.R., Mersebau, W.A. :

Observations on thrombosis and endothelial repair following application of external pressure to a vein.

Canad. J. Surg. 3, 5 (1959).

Robinson, P. :

A cholinergic component in the innervation of the longitudinal smooth muscle of the guinea pig vas deferens. The fine structural localization of acetylcholinesterases.

J. Cell. Biol. 41, 462 (1969).

Romanul, F. and Bannister, R. :

Localized areas of high alkaline phosphatase activity in the terminal arterial tree.

J. Cell Biol. 15, 73 (1962).

Rosenthal, A., Moses, H., Beaver, D., Schuffman, S. :

Lead ion and phosphatase histochemistry ; I. Non-enzymatic hydrolysis of nucleoside phosphatase by lead ion.

J. Histochem. Cytochem. 14, 698 (1968).

Rosenthal, A., Moses, H., Ganote, Ch., Tice, L. :

The participation of nucleotide in the formation of phosphatase reaction product : a chemical and electron microscope autoradiographic study.

J. Histochem. Cytochem. 17, 12, 839 (1969).

Rosenthal, A., Moses, H., Tice, L., Ganote, Ch. :

Lead ion and phosphatase histochemistry. III. The effects of lead and adenosine tri-phosphate concentration on the incorporation of phosphate into fixed tissue.

J. Histochem. Cytochem. 17, 9, 608 (1969).

Rosenthal, A., Moses, H., Ganote, Ch. :

Interpretation of phosphatase cytochemical data.

J. Histochem. Cytochem. 18, 915 (1970).

Ross, R., Bornstein, P. :

The elastic fiber. I. The reparation and partial characterization of its macromolecular components.

J. Cell Biol. 40, 366 (1969).

Rostgaard, J. and Behnke, O. :

Fine structural localization of adenine nucleoside phosphatase activity in the sarcoplasmic reticulum and the T system of rat myocardium.

J. Ultrastruct. Res. 12, 579 (1965).

Rubio, R. and Berne, R. :

Release of adenosine by the normal myocardium in dogs and its relationship to the regulation of coronary resistance.

Circ. Res. 25, 407 (1969).

Schaper, W.K.A. :

Der Einfluss physikalischer Faktoren auf das Radialwachstum von Kollateralgefäßen im Koronarkreislauf.

Verh. deutsch. Ges. Kreisf.-Forsch. 32, 282 (1966).

Schaper, W.K.A. :

The collateral circulation in the canine coronary system.

Thesis, University of Louvain, Belgium (1967 a).

Schaper, W.K.A. :

Tangential wall stress as a molding force in the development of collateral vessels in the canine heart.

Experientia, 23, 595 (1967 b).

Schaper, W.K.A. :

The collateral circulation of the heart.

Ed. W. Schaper, Publ. North-Holland, Amsterdam (in press).

Schaper, W.K.A., Schaper, J., Xhonneux, R., Vandesteene, R. :

The morphology of intercoronary anastomoses in chronic coronary artery occlusion.

Cardiovascular Research 3, 315 (1969).

Schaper, W., De Brabander, M., Lewi, P. :

DNA-synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog.

Circ. Res. (in press).

Scott, R.F., Jones, R., Daoud, A.S., Zumbo, O., Coulston, F. and Thomas, W.A. :

Experimental atherosclerosis in rhesus monkeys. II. Cellular elements of proliferative lesions and possible role of cytoplasmic degeneration in pathogenesis as studied by electron microscopy.

Exptl. Mol. Pathol. 7, 34 (1967).

Sevier, A. and Munger, B. :

The use of oxone to facilitate specific tissue stainability following osmium fixation.
Anat. Rec. 162, 43 (1968).

Shively, J.N., Feldt, C., Davis, D. :

Fine structure of formed elements in canine blood.
Amer. J. Vet. Res. 30, 883 (1969).

Spurlock, B.O., Skinner, M.S., Kattine, A.H. :

A simple rapid method for staining epoxy embedded specimens for light microscopy with the polychromatic stain paragon 1301.
Amer. J. Clin. Path. 46, 252 (1966).

Stehbens, W. :

Reaction of venous endothelium to injury.
Lab. Invest. 14, 449 (1965).

Stein, A. and Harris, J. :

Histochemical enzyme distribution in human arteries.
Surgery 56, 413 (1964).

Stein, A., Rosenblum, I. and Leather, R. :

Intimal sclerosis in human veins.
Arch. Path. 81, 548 (1966).

Still, W.J. and Marriott, P.R. :

Comparative morphology of the early atherosclerotic lesion in man and cholesterol-atherosclerosis in the rabbit. An electronmicroscopic study.
J. Atherosclerosis Res. 4, 373 (1964).

Still, W.S. :

The early effect of hypertension on the aortic intima of the rat.
Am. J. Pathol. 51, 721 (1967).

Takamatsu, H. :

Histologische und biochemische Studien über die Phosphatase (I. Mitteilung) Histochemische Untersuchungsmethodik der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben.
Trans. Soc. Path. Japan 29, 429 (1939).

- Thomas, W.A., Jones, R., Scott, R.F., Morrison, E., Goodale, F., Imai, H. :
Production of early arteriosclerotic lesion in rats characterized by proliferation of "modified smooth muscle cells".
Exptl. Mol. Pathol. suppl. 1, p. 40 (1963).
- Tice, L. and Barrnett, R. :
Fine structural localization of ATPase activity in heart muscle fibers.
J. Cell Biol. 15, 401 (1962a).
- Tice, L. and Barrnett, R. :
Fine structural localization of G-6-Pase in rat liver.
J. Histochem. Cytochem. 10, 754 (1962b).
- Torack, R. and Barrnett, R. :
The fine structural localization of nucleoside phosphatase activity in the bloodbrain barrier.
J. Neuropathol. Neurol. 23, 46 (1964).
- Ts'ao, C., Spaet, T.H. :
Ultramicroscopic changes in the rabbit inferior vena cava following partial constrictions.
Amer. J. Path. 51, 789 (1967).
- Veress, B., Kadar, A. and Jellinek, H. :
Ultrastructural elements in intimal thickening. I. Electron microscopic study of the development of cellular elements of intimal proliferation.
Exptl. Mol. Pathol. 11, 200 (1969).
- Wachstein, M. and Meisel, E. :
On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase.
J. Histochem. Cytochem. 4, 592 (1956).
- Wachstein, M. and Meisel, E. :
Histochemistry of hepatic phosphatase at a physiologic pH, with reference to the demonstration of bile canaliculi.
Amer. J. Clin. Path. 27, 13 (1957).
- Watson, M. :
Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 475 (1958).

Weibel, E., Palade, G. :

New cytoplasmic components in arterial endothelia.

J. Cell Biol. 23, 101 (1964).

Weinstein, D., Sommer, J., Beaudreau, G., Becher, C., Nonar, R. and Beard, J.

Virus of avian myeloblastosis. XVIII. Fixation of myeloblasts and phosphatase activity of loci of virus synthesis (viroplasts).

J. Nat. Cancer Inst. 25, 1421 (1960).

Wissler, R.W. :

The arterial medial cell, smooth muscle of multifunctional mesenchyme.

J. Atherosclerosis Res. 8, 201 (1968).

Yarmolych, J., Daoud, A.S., Landau, J., Fritz, K.E. and McElvene, E. :

Aortic media explants. Cell proliferation and production of mucopolysaccharides, collagen and elastic tissue.

Exptl. Mol. Pathol. 9, 171 (1968).

Zemplenyi, T., Lojda, Z. and Mhrova, O. :

Enzymes of the vascular wall in experimental atherosclerosis in the rabbit. In Atherosclerosis and its origin. Sandler, M. and Bourne, G., Eds. New York and London Publ. Academic Press (1963).

Zemplenyi, T. :

In "Enzyme biochemistry of the arterial wall".

Ed. T. Zemplenyi. Publ. Lloyd-Luke Ltd. London (1968).

Zemplenyi, T., Mhrova, O. and Grafnetter, D. :

The lipolytic activity and the activity of some other enzymes of the arterial wall in different species.

Bull. Soc. Roy. Zool. Anvers 37, 55 (1965).

Ziegler, D. and Linnane, A. :

Studies on the electron transport system. XIII. Mitochondrial structure and dehydrogenase activity in isolated mitochondria.

Biochim. Biophys. Acta 30, 53 (1958).

ICONOGRAPHIE

Figure 1

La distribution des anastomoses épicardiques du ventricule gauche.

S = segment de souche

M= segments médians

R = segment terminal

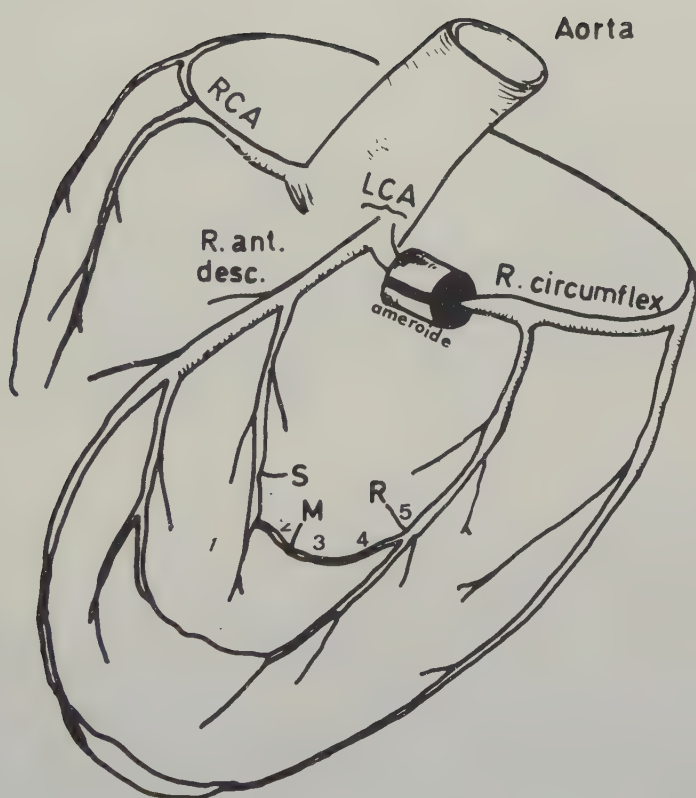


Figure 2

Animal témoin. Paroi vasculaire d'une anastomose interartérielle préexistante : endothélium (E) ; lamelle élastique (EL), cellules musculaires lisses de la média (M), collagène (C) du tissu conjonctif (X 14.800).

Figure 3

Animal témoin. Détail ultrastructural de l'intima, montrant les différents composants intracytoplasmiques d'une cellule endothéliale (E), le matériel élastique (EL), la substance basale et les corps ronds (CR) probablement les résidus de cellules nécrotiques (X 24.300).

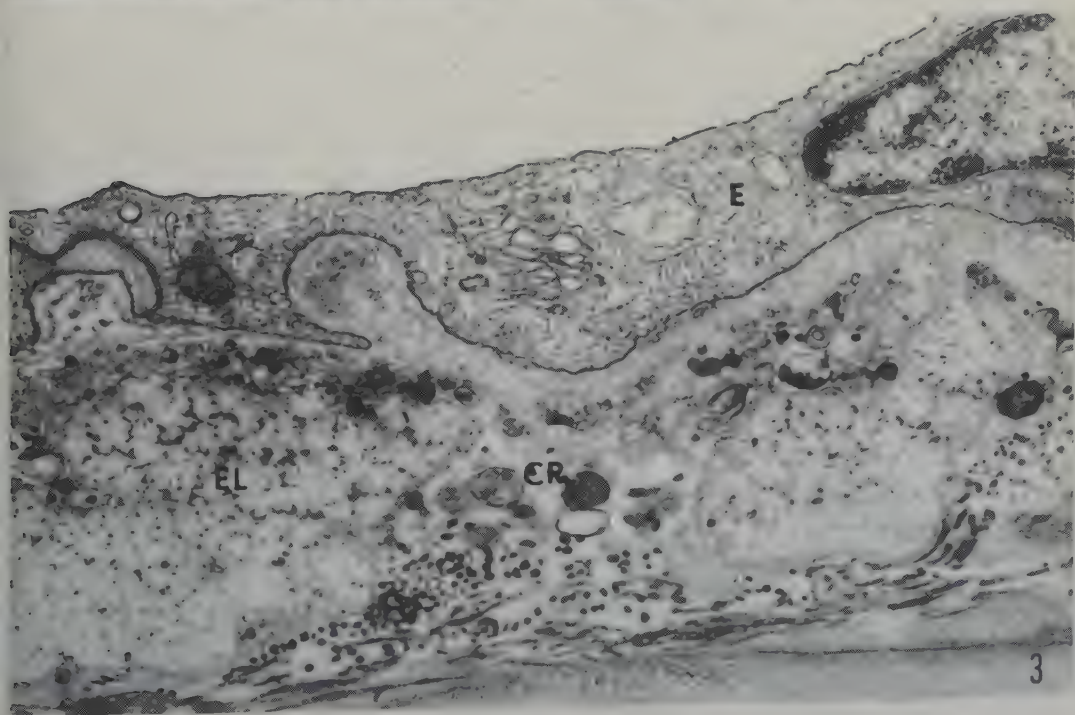


Figure 4

Animal témoin. Vue détaillée sur des cellules musculaires lisses de la média : myofilaments (mf), vésicules de pinocytose (vp), membrane basale (mb), collagène (C), mitochondrie (mi), ergastoplasme (er), glycogène (gl) (X 42.000).

Figure 5

Animal témoin. Tissue conjonctif d'une artère de dimension moyenne, montrant quelques portions de fibrocytes (FI), des plaquettes de matériel élastique (el), une cellule nerveuse (N) et de nombreuses fibres de collagène (C). Les cellules musculaires lisses (M) sont coupées tangentiellement (X 7.200).

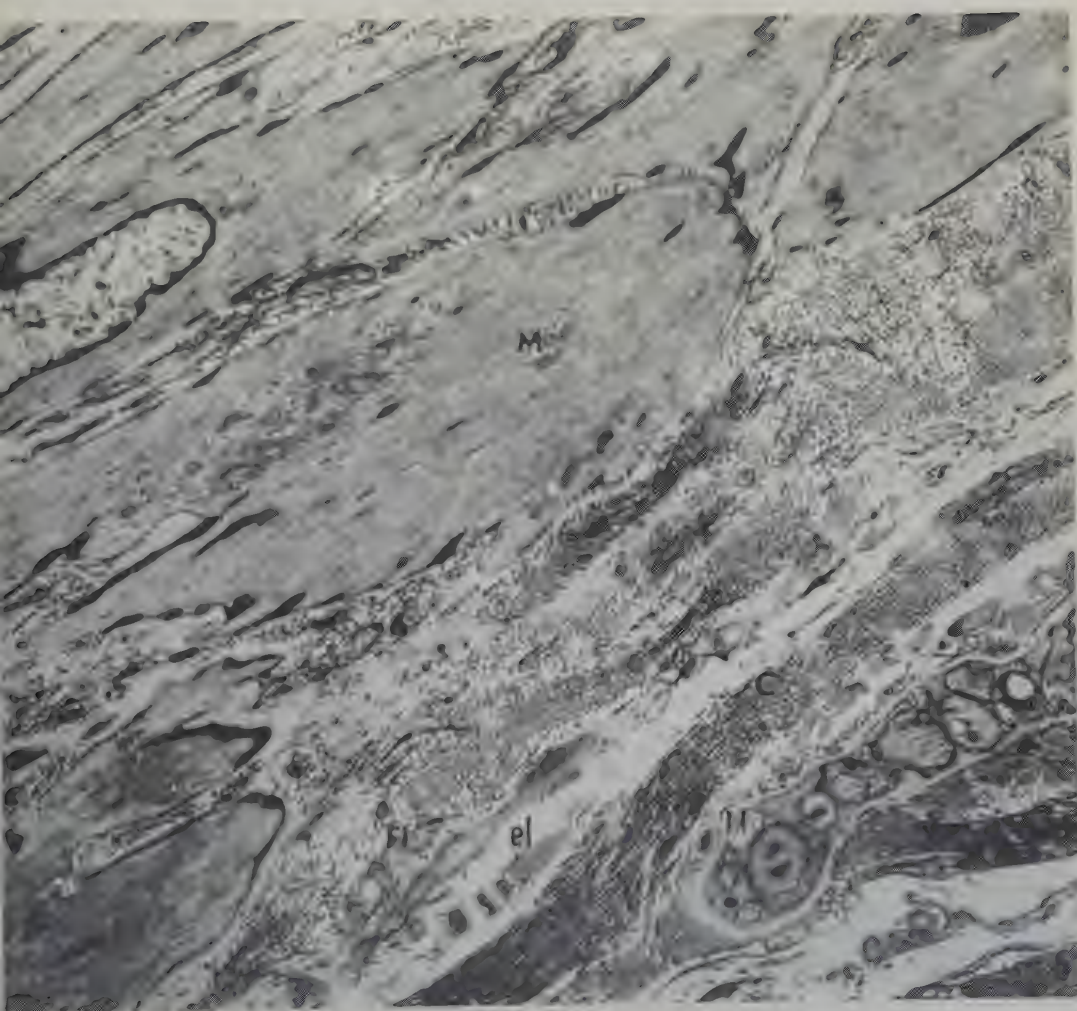
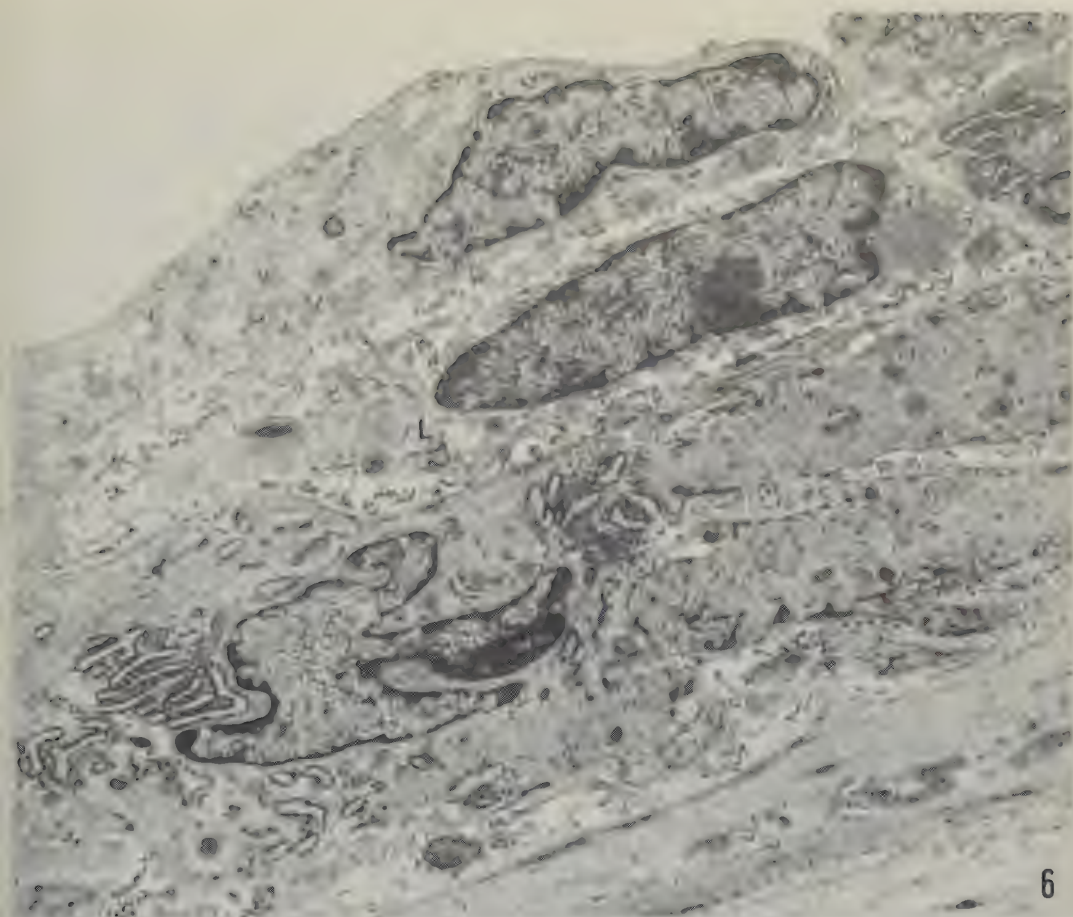


Figure 6

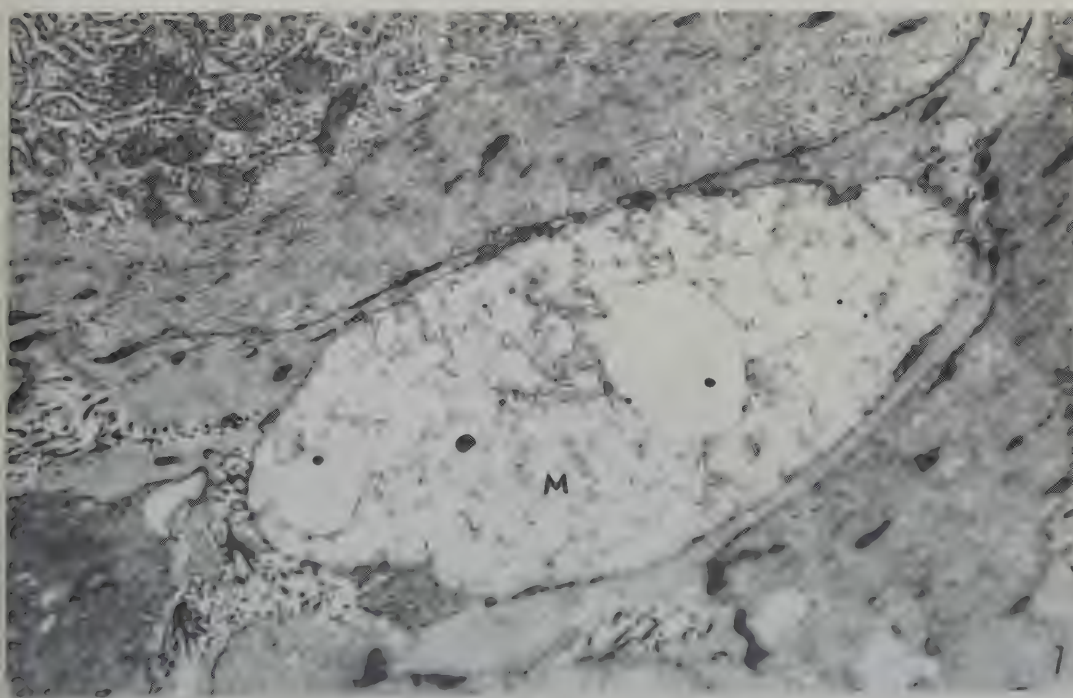
3 semaines post-opératoires. Paroi vasculaire d'un segment 2. Quelques cellules musculaires (M) dans la média montrent des modifications ergastoplasmiques. Notez la présence subendothéliale d'un leucocyte (L) (X 11.800).

Figure 7

3 semaines post-opératoires. La média d'une paroi collatérale prise au segment 3 montre une cellule musculaire lisse (M) dans un état nécrotique avancé (X 15.540).



6



7

Figure 8

3 semaines post-opératoires. Vue générale de la paroi vasculaire très altérée, prise au segment 4. La média contient des cellules musculaires altérées (M), des leucocytes (L), des érythrocytes (ERY), et des trombocytes (T). La couche endothéliale (E) semble intacte (X 7.400).

Figure 9

Stade 3 semaines, segment 4. Nécrose des cellules adventitielles (F) ; les cellules musculaires (M) à la jonction média-adventitia sont encore relativement intactes (X 13.300).

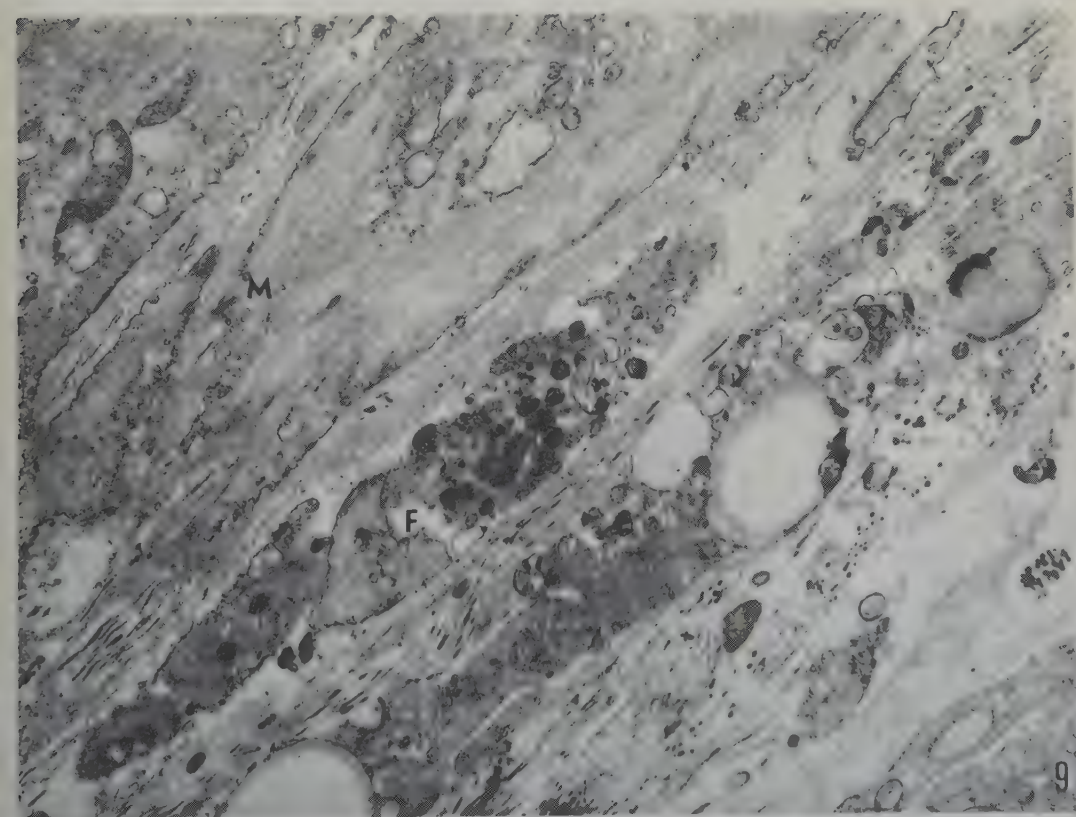
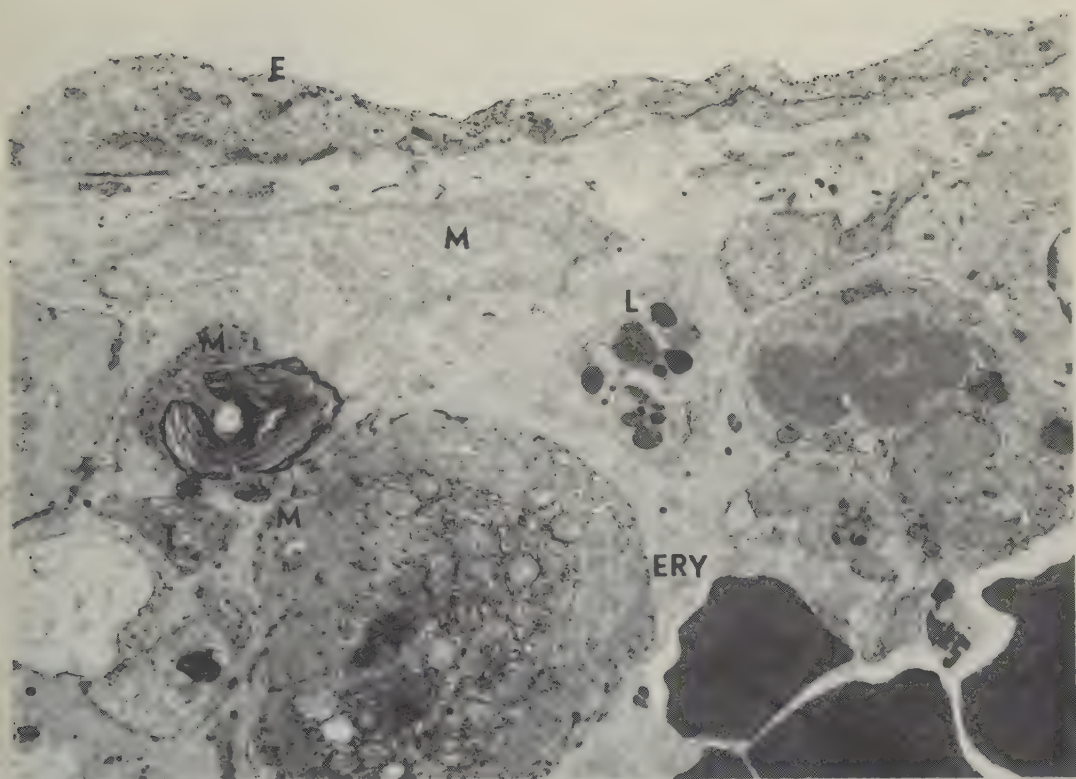


Figure 10

Stade 8 semaines. Image de l'épaississement intimal. L'infiltration d'un leucocyte polymorphonucléaire (L) du côté luminal est visible. La zone subendothéliale est composée de cellules musculaires lisses normales (M) et modifiées (Mm), toutes mal-organisées. Une partie de la couche musculaire circulaire (Mc) de la média est visible dans la partie basse (X 5.400).

Figure 11

Stade 8 semaines. Jonction entre la zone proliférative subendothéliale et la média. Notez la direction opposée des myofibrilles dans les cellules musculaires de la zone proliférative d'une part (M) et de la média d'autre part (Mc). Des fragments de la lamelle élastique (EL) séparent les deux zones (X 12.500).

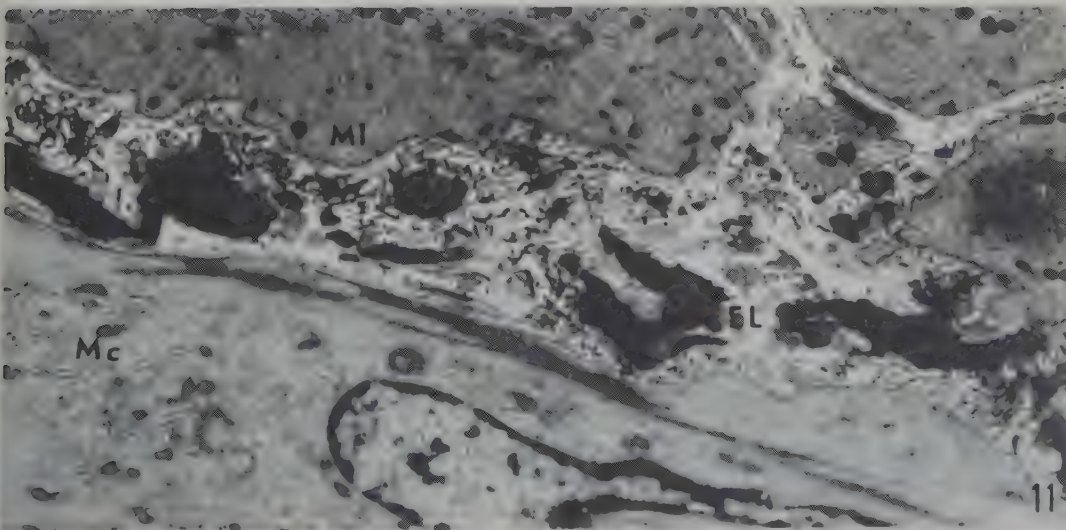


Figure 12

Stade 12 semaines. Vue générale d'un vaisseau collatéral hyperproliféré.

Les cellules, très espacées les unes des autres, sont surtout du type musculaire lisse, en position longitudinale. Endothélium (E) (X 3.400).

Figure 13

Stade 12 semaines. Image de la pénétration d'un fibroblaste (FI) au travers des couches musculaires (M) de la média (X 7.700).

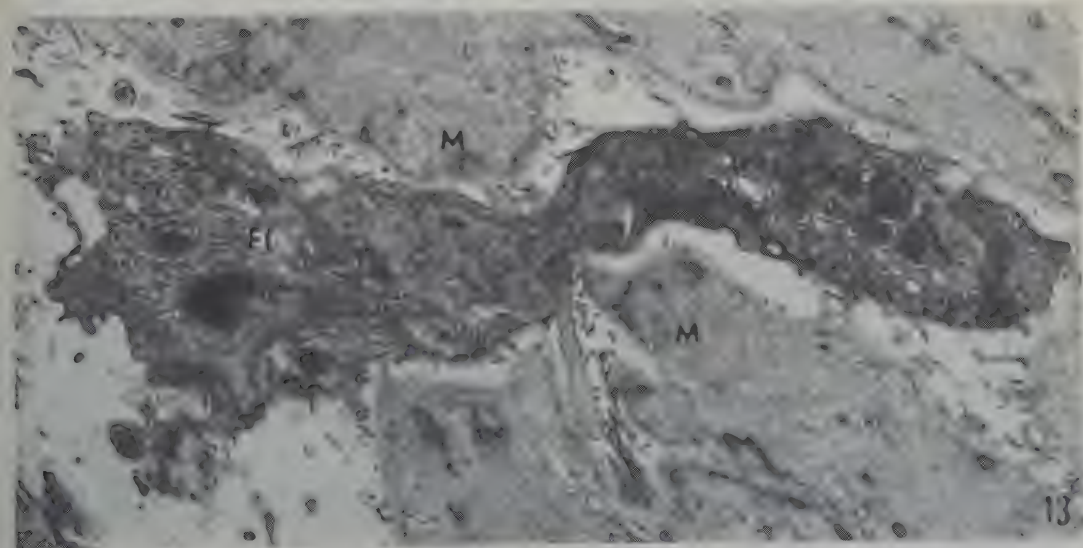
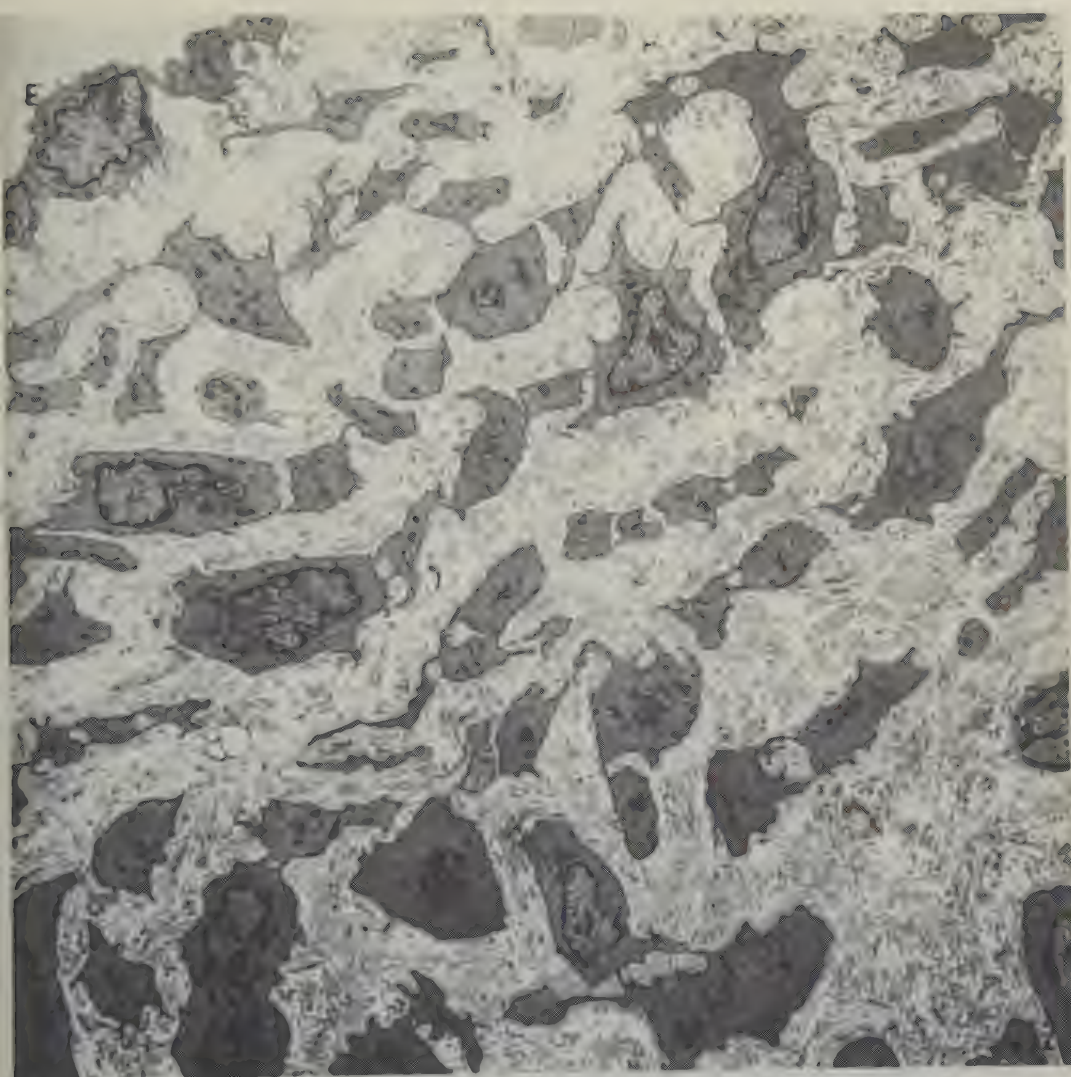


Figure 14

Stade 1 an. Apparence générale de la zone médiane d'un vaisseau anastomosé. La couche subendothéliale, bien séparée de la média par les fragments de la lamelle élastique originale (EL), ne comprend que deux rangées cellulaires. Une formation "de novo" du matériel élastique (el) est présente dans cette zone. Cellules musculaires lisses circulaires (Mc) et longitudinales (MI) (X 10.200).



Figure 15

Stade 2 ans. Segment 3. Une réorganisation de la média est indiquée par la position des cellules musculaires lisses. Notez l'existence de nombreuses fibres de collagène (C) dans les espaces intercellulaires (X 13.600).

Figure 16

Stade 2 ans. Le tissu conjonctif a acquis une apparence normale, quoique les plaquettes de matériel élastique ne soient pas présentes. Fibrocytes (FI) ; collagène (C) (X 15.500).

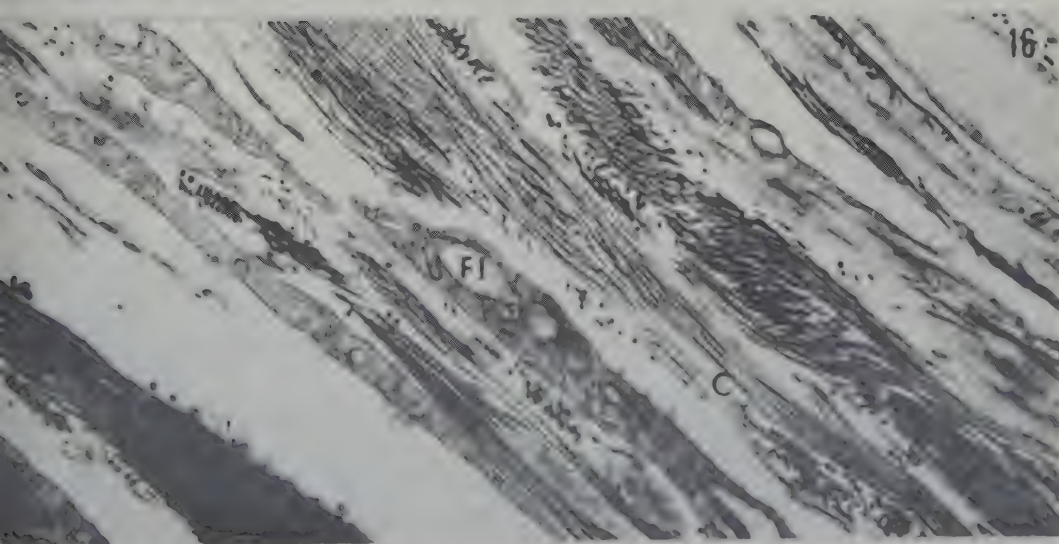


Figure 17

Réaction ATPasique dans la paroi artériolaire d'un animal normal. Le précipité de phosphate de plomb est localisé au niveau de la membrane cellulaire et des vésicules de pinocytose des cellules endothéliales (E) et musculaires lisses (M) (X 15.500).

Figure 18

ATPase dans un plexus nerveux (N) situé dans le tissu conjonctif d'une artère normale. Le produit de réaction est présent dans les espaces intermembranaires (X 27.800).

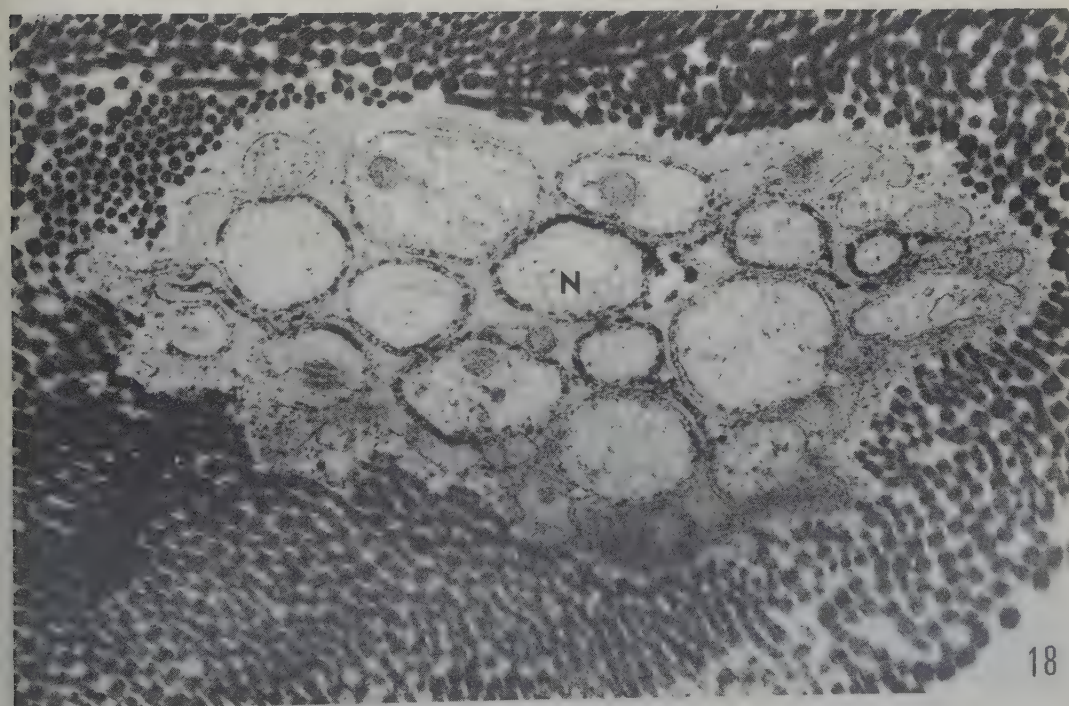
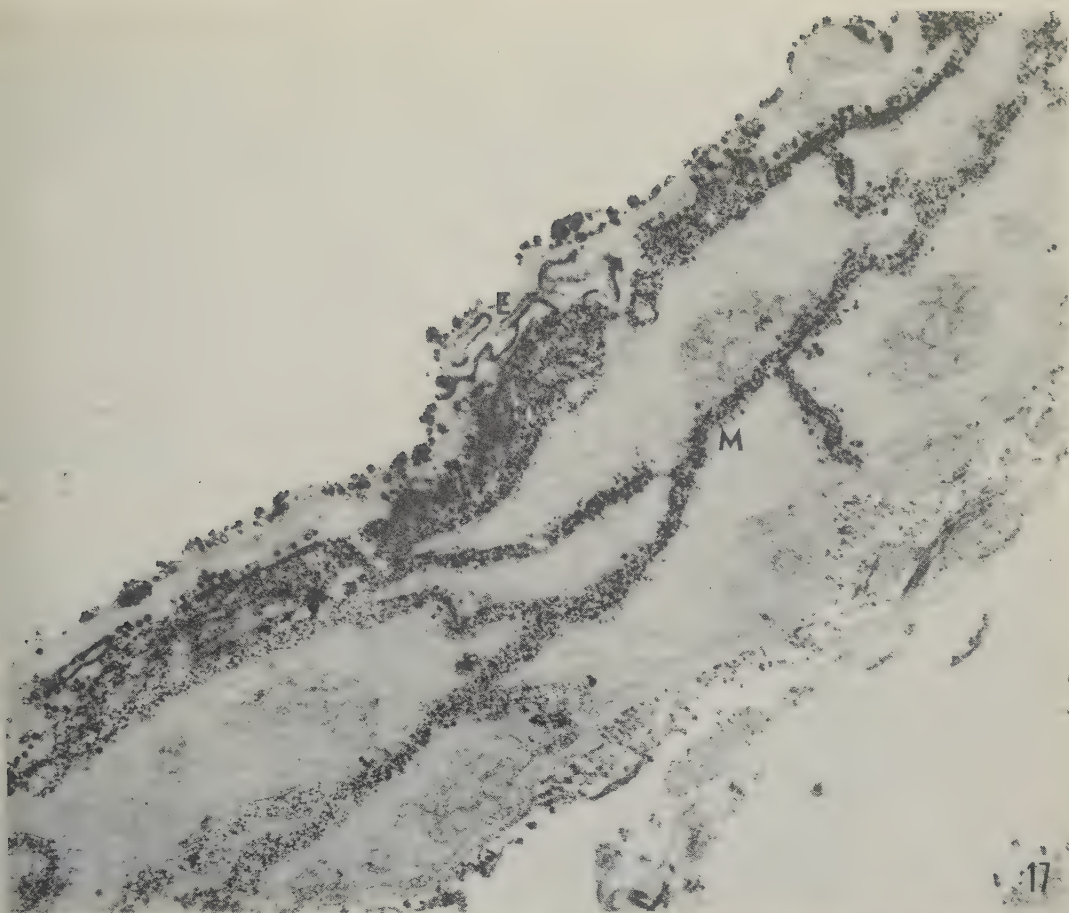


Figure 19

ATPase dans un vaisseau collatéral (segment médian) 2 ans après développement. La distribution dans les cellules endothéliales (E), la musculature lisse (M) et les fibroblastes (FI) est très comparable à celle de l'artère normale (X 12.400).

Figure 20

ADPase d'un vaisseau anastomosé au stade précoc (3 semaines post-opératoires). La réaction persiste au niveau de l'endothélium (E), tandis que les cellules musculaires de la média (M) sont indemnes de précipité (X 12.400).

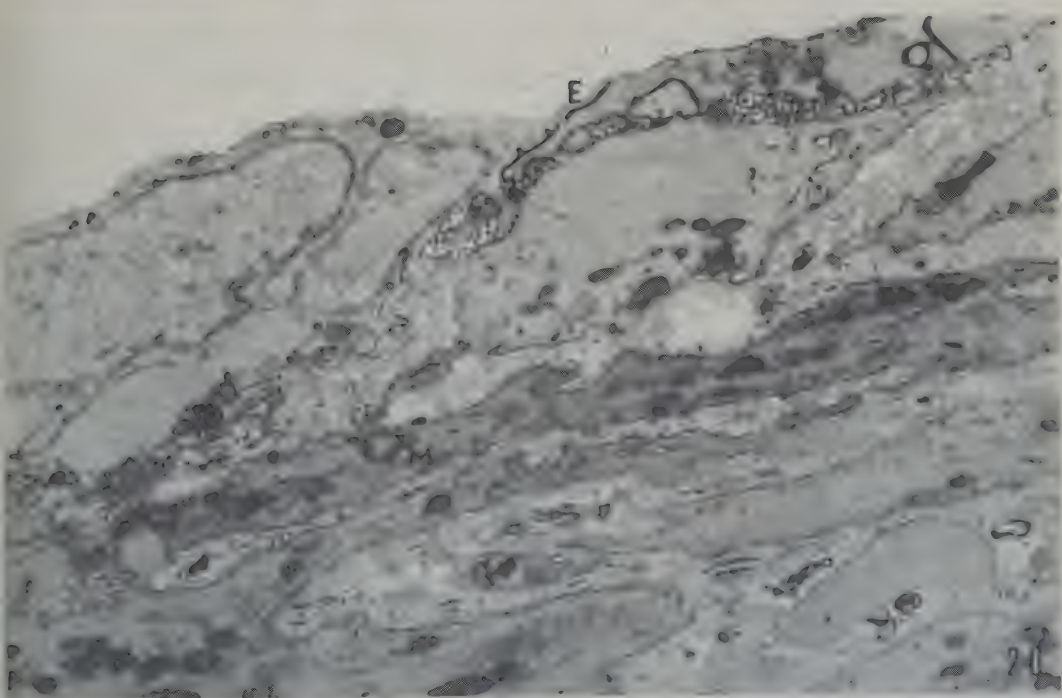
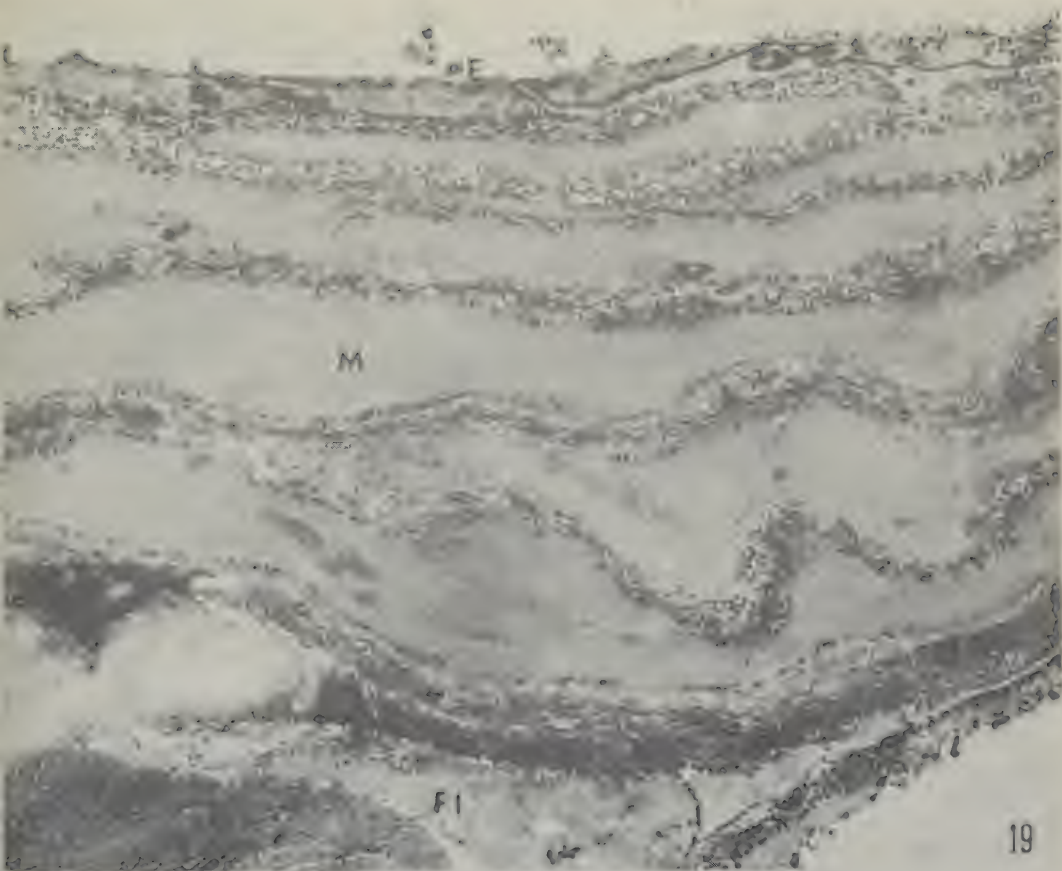
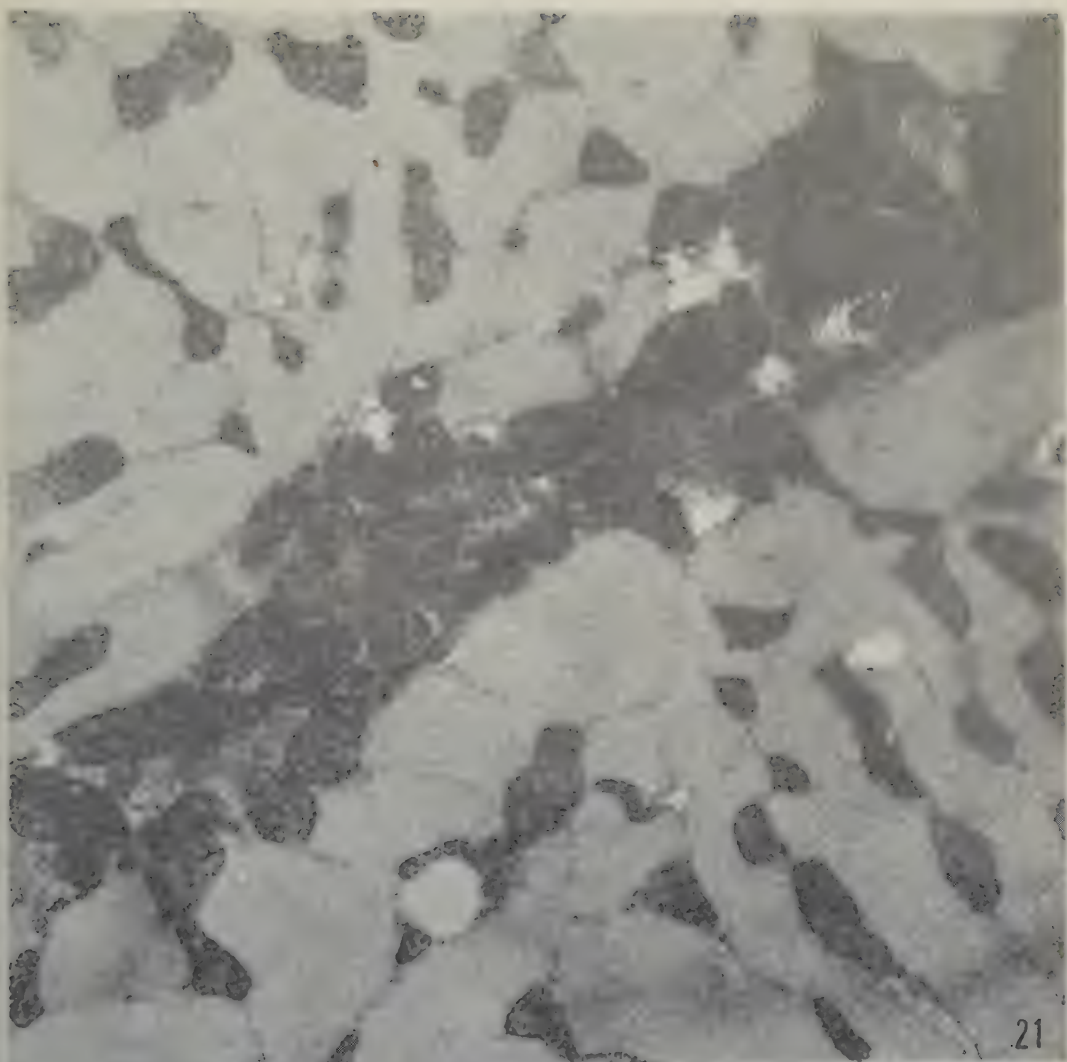


Figure 21

ATPase dans une cellule myocardique, à proximité d'un vaisseau en développement au stade 1 an. Le phosphate de plomb se trouve dans les matrices mitochondriales, très bien visible dans l'image agrandie, et dans les éléments spécialisés du réticulum sarcoplasmique (flèches dans la partie basse) (X 17.000 et X 91.300).



21

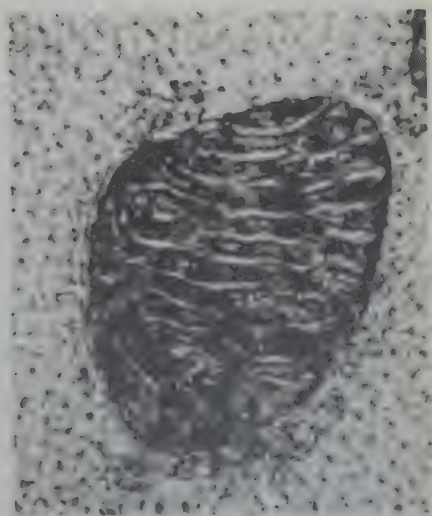
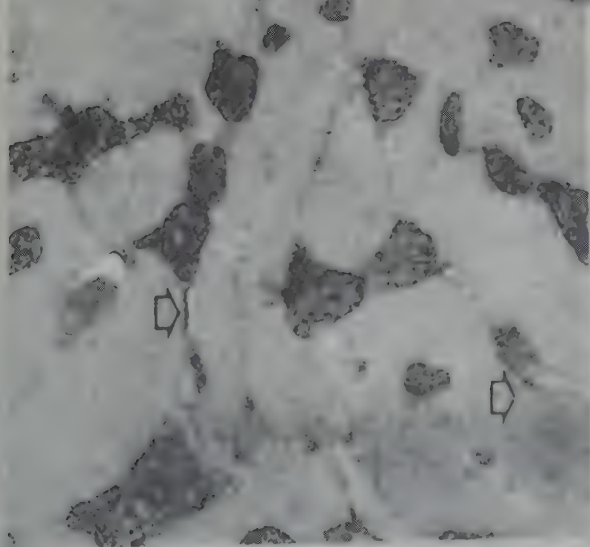


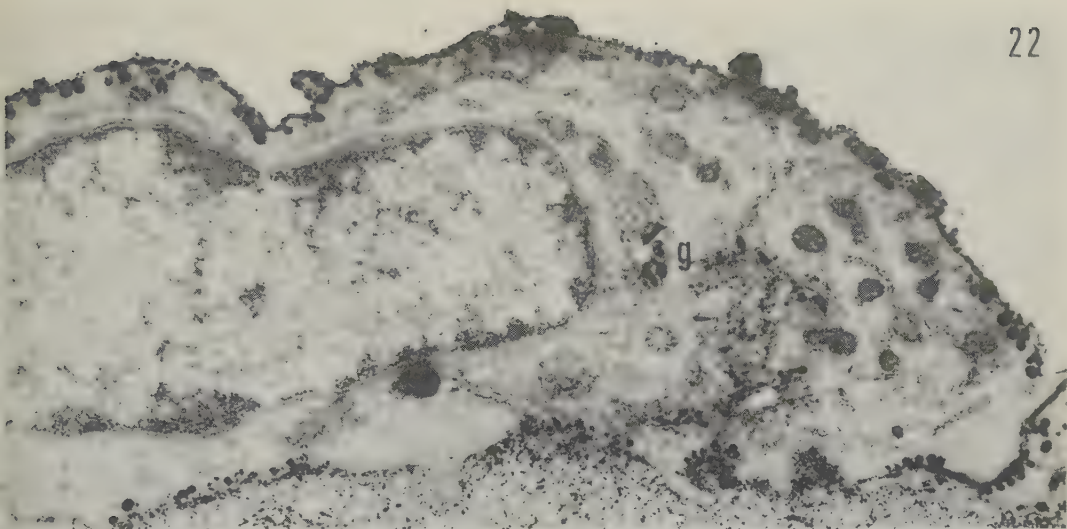
Figure 22

TPPase dans une cellule endothéliale d'une artère coronaire normale.
Le produit de réaction est visible tout le long de la membrane plasmatique,
dans les nombreuses vésicules de pinocytose et l'appareil golgien (g) (X 20.700).

Figure 23

TPPase dans une artériole terminale et dans une cellule myocardique d'un animal témoin. L'activité se situe dans les vésicules de pinocytose (vp) à la périphérie cellulaire et dans les saccules golgiennes (g) de la cellule myocardique (MY).
(X 18.000)

22



23

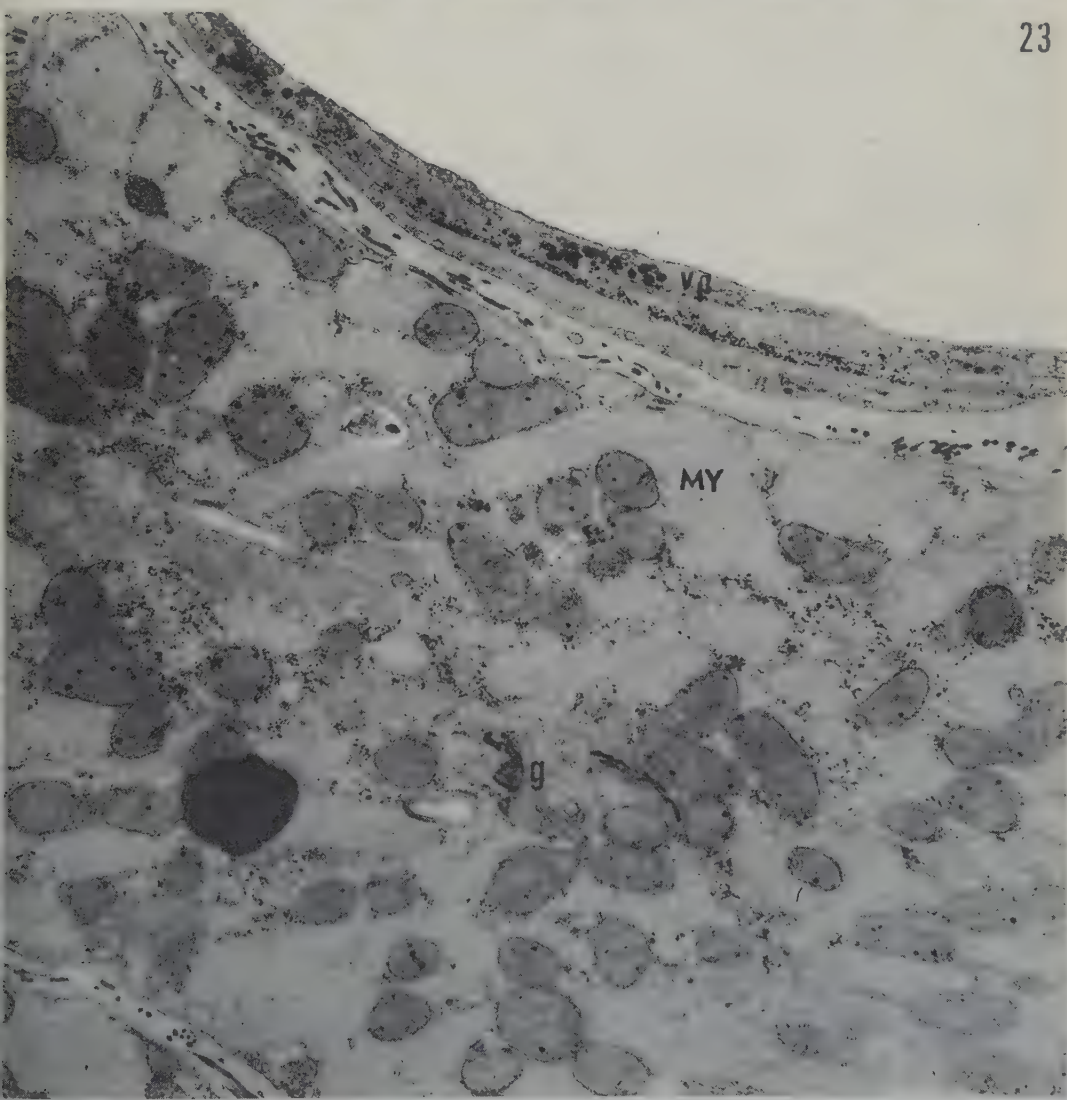


Figure 24

TPPase dans un vaisseau collatéral 3 semaines après induction du développement. La membrane cellulaire latérale (mc), les vésicules pinocytaires et l'appareil de Golgi (g) de l'endothélium ont gardé de l'activité tandis que les cellules musculaires lisses ne retiennent la réaction que dans les saccules golgiennes (g).
(X 14.800)

Figure 25

TPPase dans une cellule musculaire lisse modifiée, de l'épaississement intimal, 12 semaines post-opératoires. L'appareil de Golgi (g) très développé, les profils réticulaires (er) et l'enveloppe nucléaire (en) sont chargés avec le produit de réaction. Notez l'absence d'activité au niveau de la membrane plasmatique (mc)
(X 15.200)

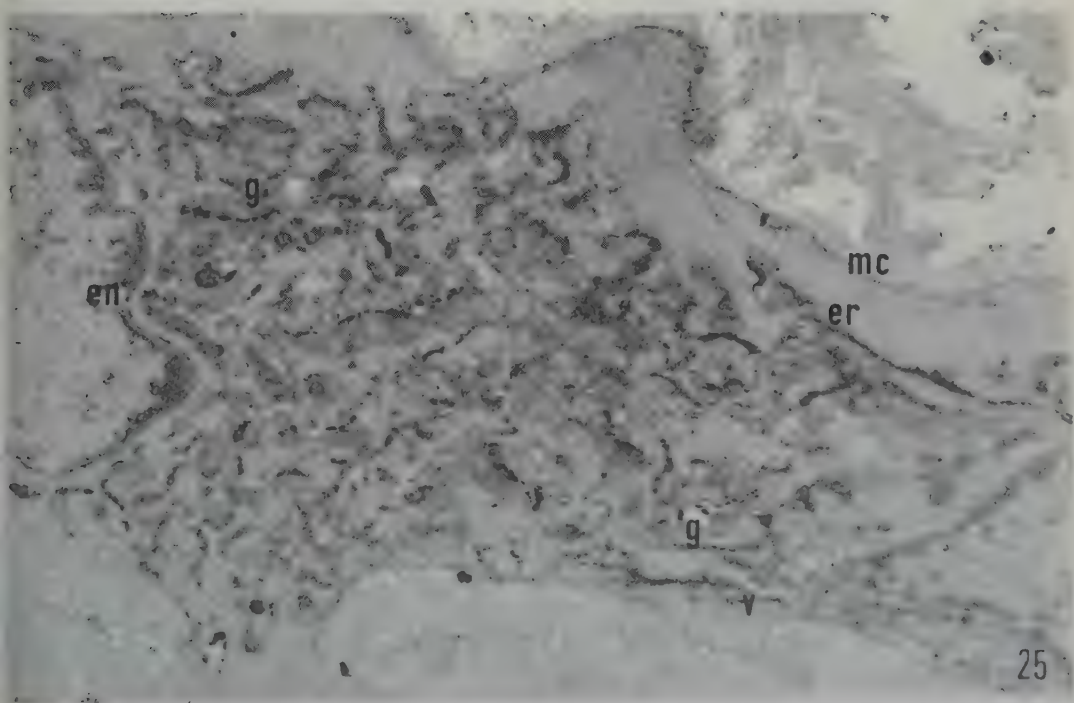
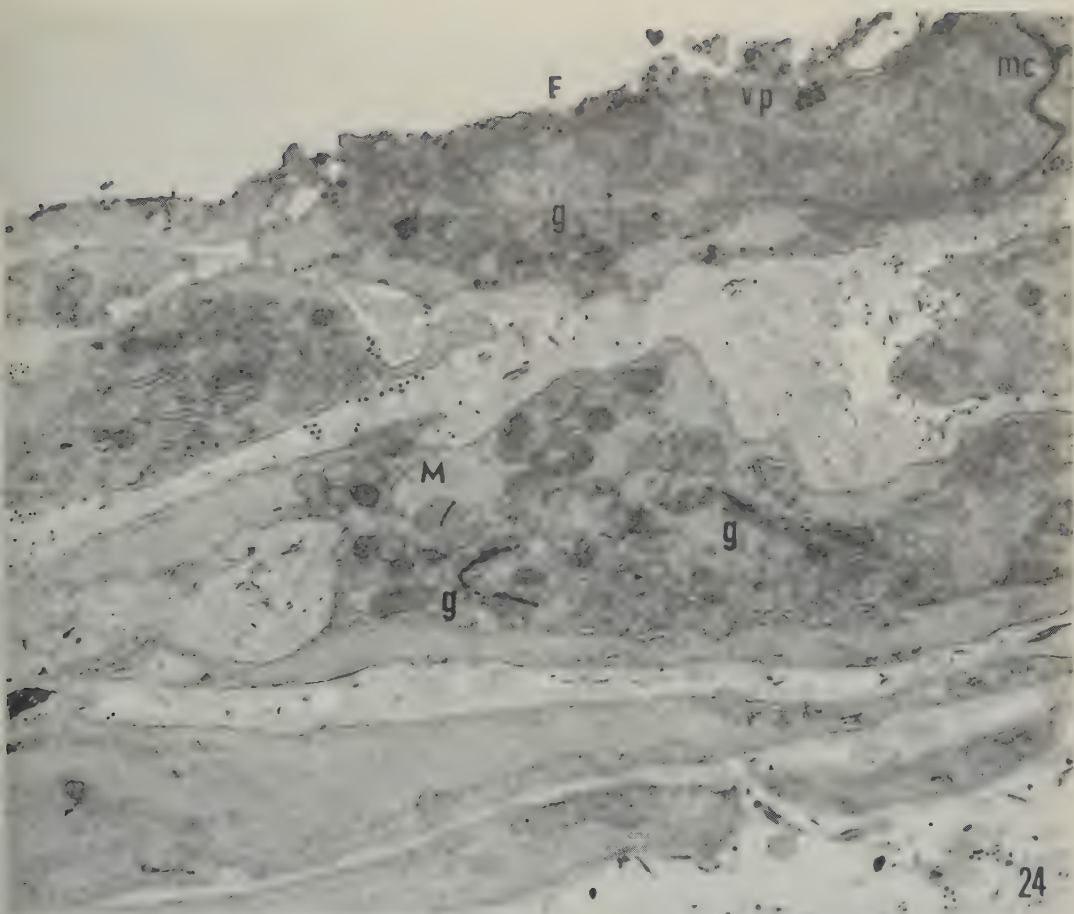


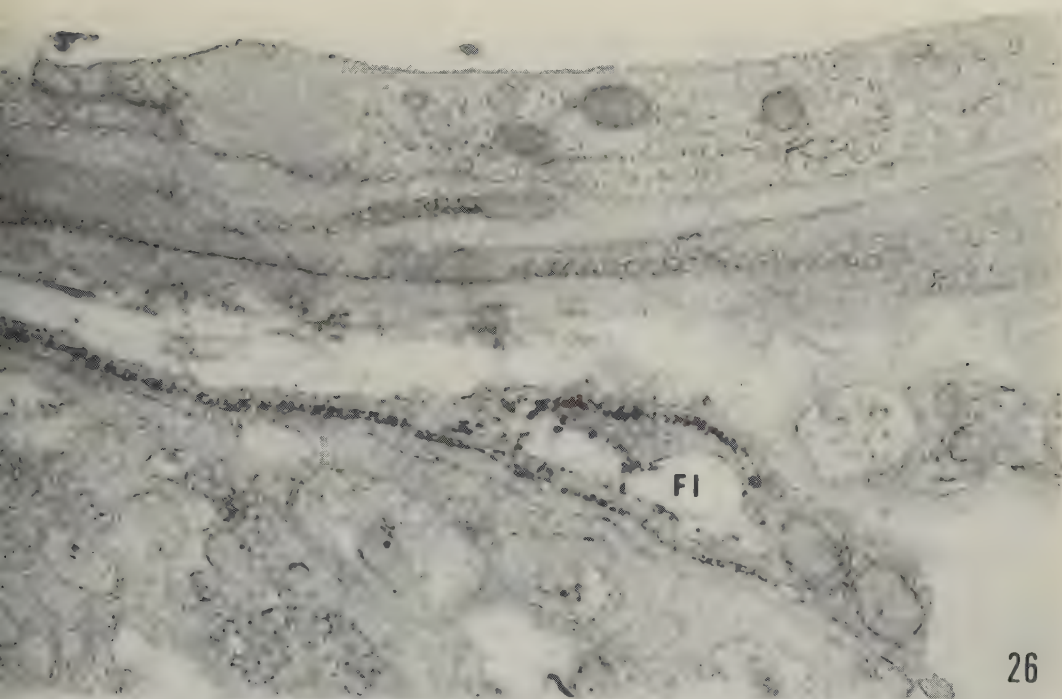
Figure 26

5'-nucléotidase dans la paroi artériolaire de l'animal témoin.

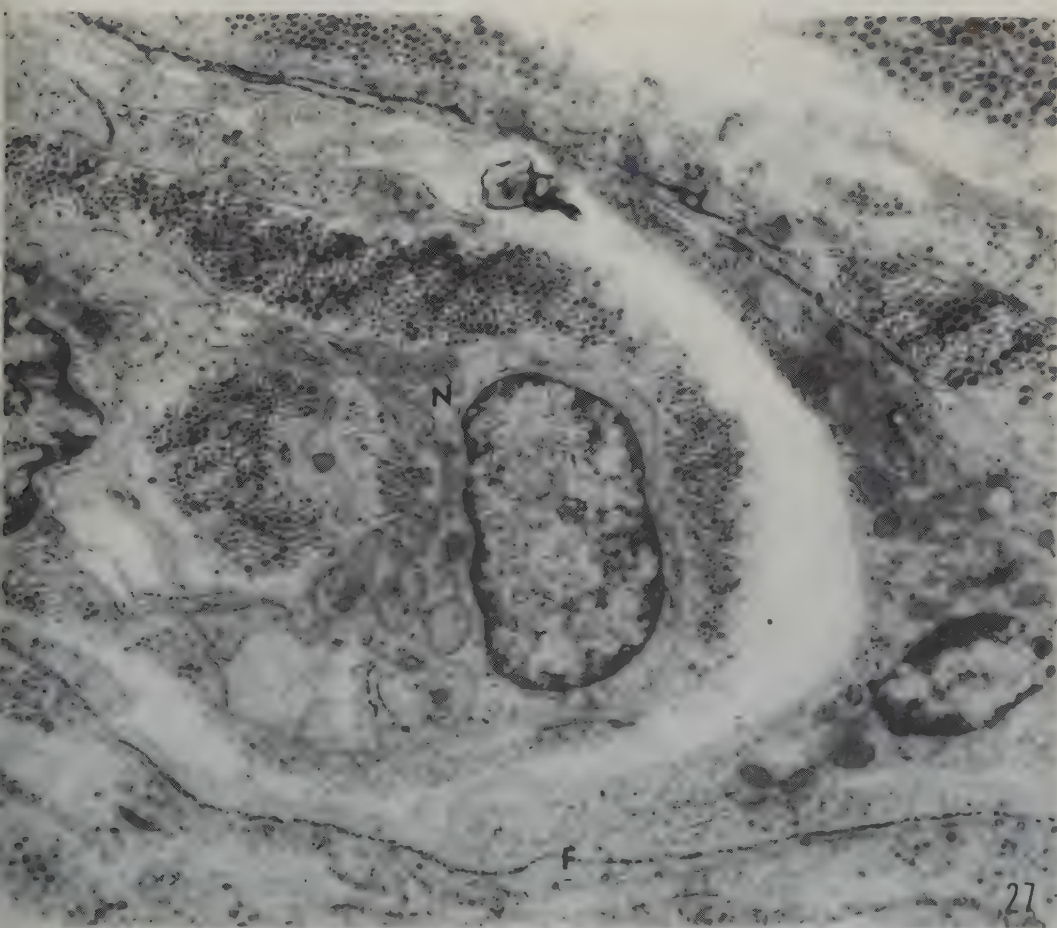
L'activité se trouve uniquement à la membrane cellulaire d'un fibroblaste (FI) du tissu conjonctif (X 33.900).

Figure 27

5'-nucléotidase dans le tissu conjonctif d'une artère coronaire normale. Les cellules mésenchymales (F) entourant des cellules nerveuses (N) montrent une activité importante à leur membrane plasmatique (X 15.500).



26



27

Figure 28

Activité 5'-nucléotidasique dans une artériole terminale, 3 semaines après induction de la croissance collatérale. Le précipité est visible dans deux portions de cellules périvasculaires (P) et dans la couche endothéliale (E). Cette dernière localisation est due à l'action interférente de l'AlPase. Les cellules musculaires lisses (M) et le neutrophile (L) ne montrent pas d'activité (X 17.000).

Figure 29

Réaction 5' -nucléotidasique dans la zone myocardique au stade 3 semaines. La cellule périvasculaire (P), située entre deux capillaires, montre une activité membranaire très intense (X 13.900).

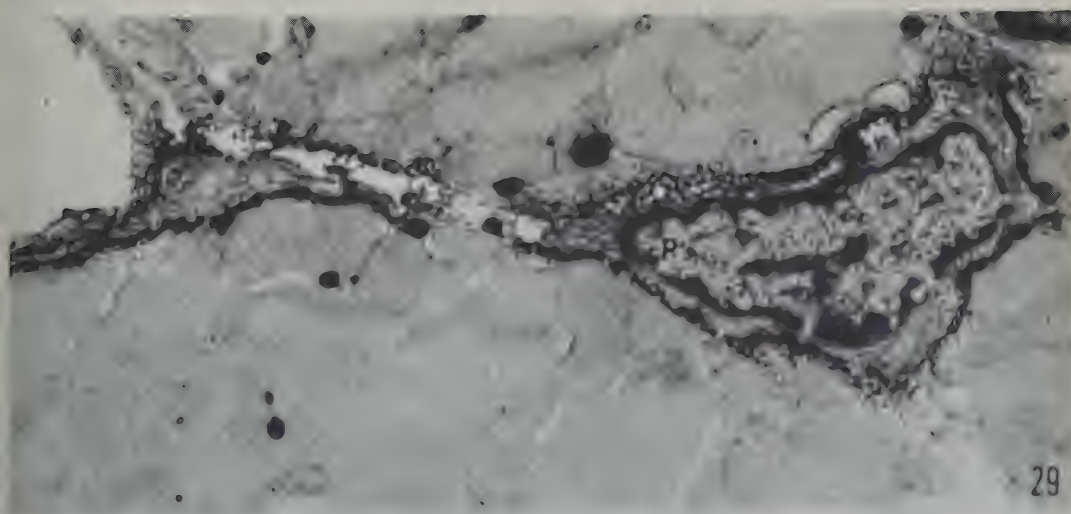
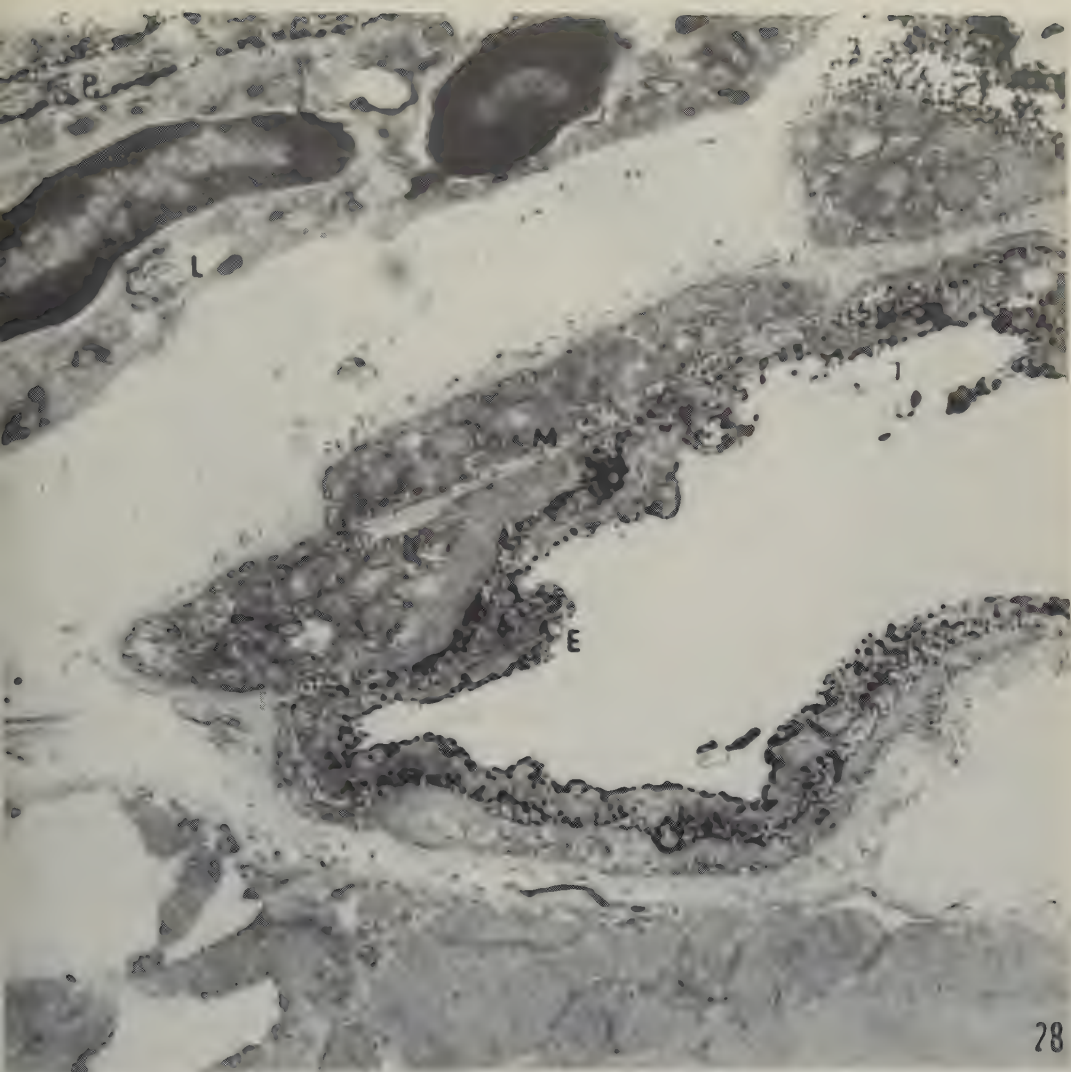


Figure 30

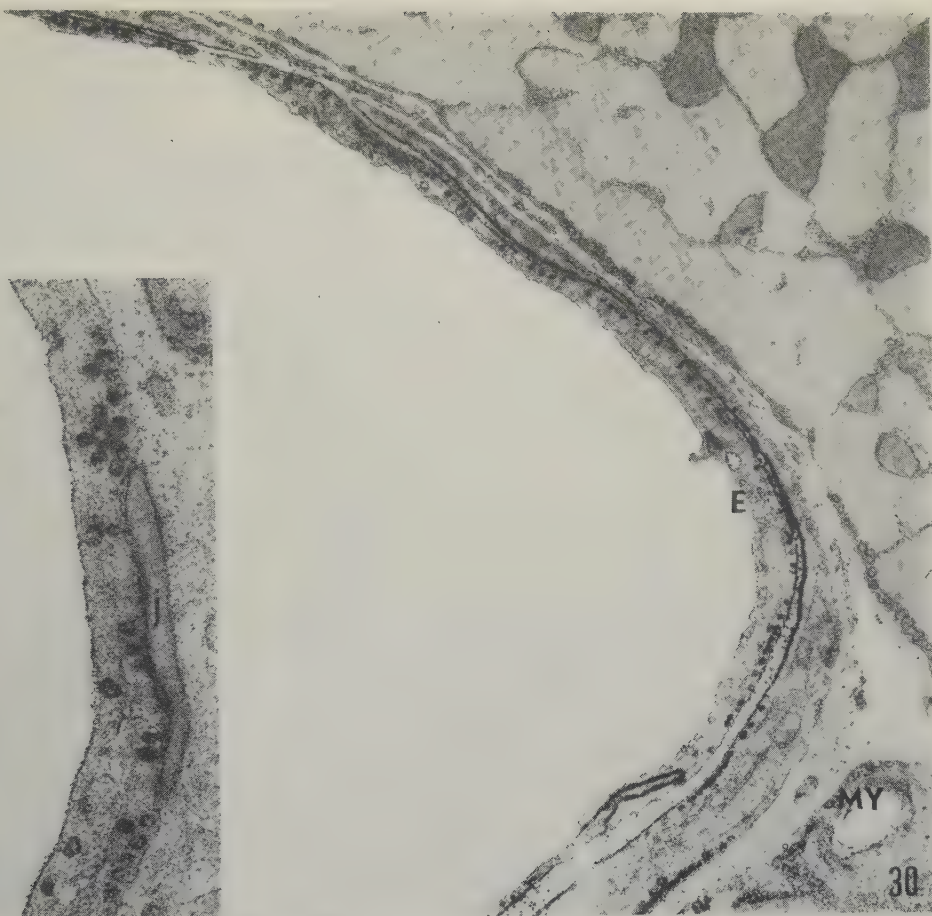
AlPase dans une artériole terminale normale. Les vésicules de pinocytose, surtout celles situées du côté basal, des cellules endothéliales (E), sont très réactives. Le produit de réaction se trouvant sur la membrane plasmatique d'une cellule myocardique (MY) est interprété comme un artéfact de diffusion (X 14.800).

Figure 31

Distribution détaillée de l'AlP dans une cellule endothéliale montrant une pinocytose très active ; les abondantes vésicules sont remplies avec le précipité. La jonction endothélio-musculaire (j) est fortement colorée (X 32.200).

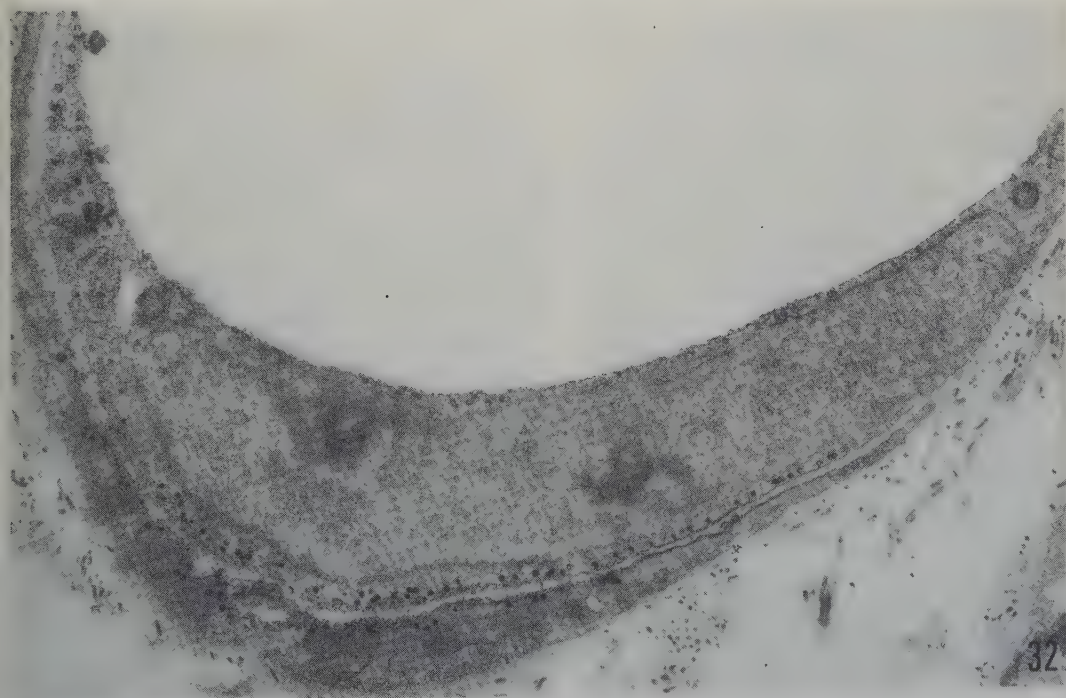
Figure 32

AlPase dans la paroi vasculaire d'une artériole au stade 2 ans. L'activité est comparable à celle trouvée dans les vaisseaux des animaux témoins (X 14.800).



31

30



32

Figure 33

ACPase dans une artère normale. Une faible activité est localisée dans quelques corps lysosomiaux (ly) des cellules musculaires lisses (X 19.900).

Figure 34

ACPase dans une cellule musculaire lisse altérée d'un segment médian au stade précoce du développement (3 semaines). L'appareil golgien (g) très étendu, est fortement marqué (X 20.700).

Figure 35

ACPase au stade précoce dans des corps denses accumulés dans le cytoplasme d'une cellule musculaire lisse très active du segment 2. (X 44.200).



Figure 36

ACPase dans une zone très lésée au stade 3 semaines. Quelques cellules nécrotiques (CN) possèdent de nombreux corps denses réactifs. Quelques vésicules golgiennes (g) sont également positives (X 10.300).

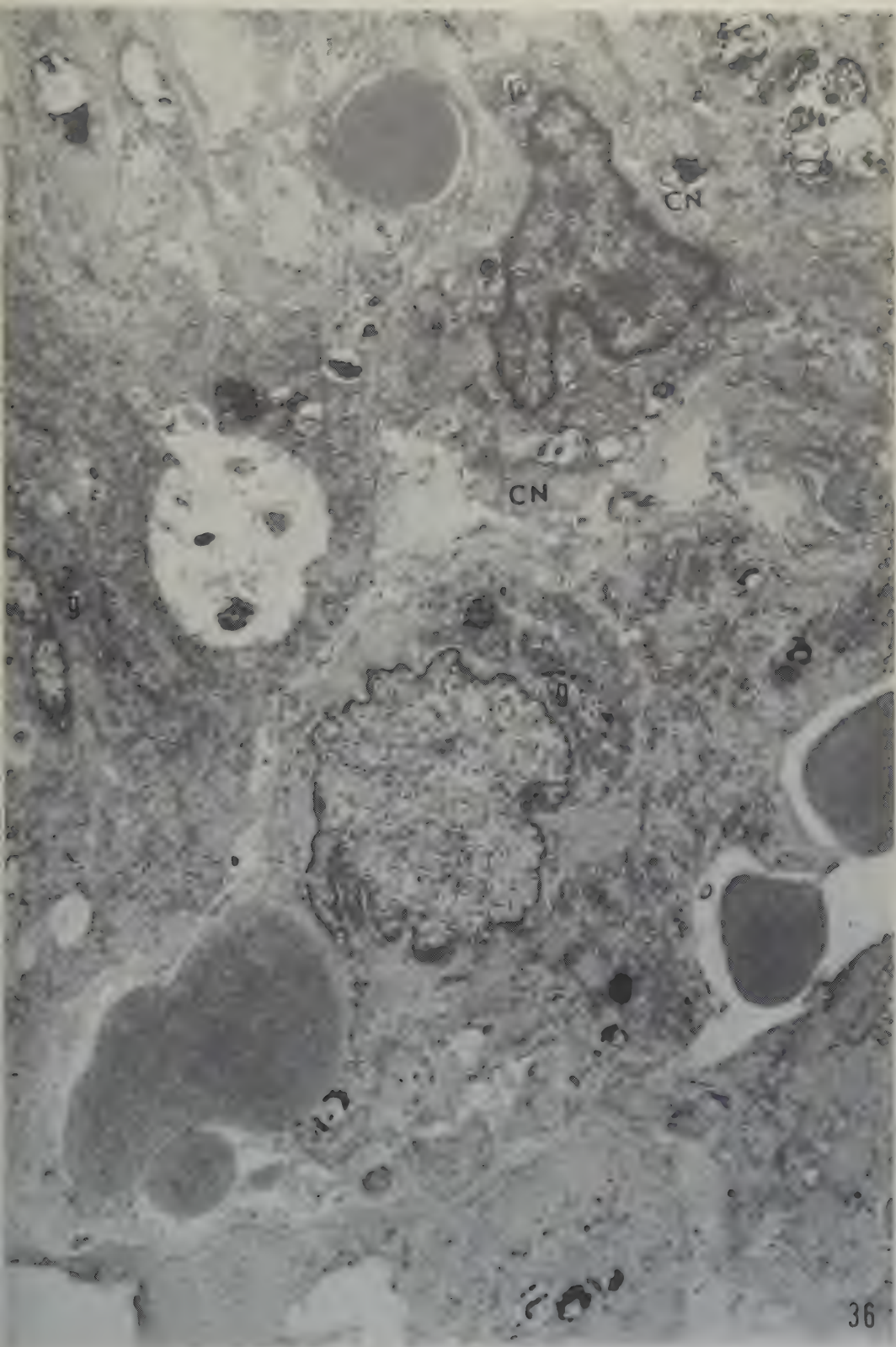


Figure 37

ACPase dans une cellule fibroblastique 3 semaines post-opératoires. De nombreux corps lysosomiaux de grandeur variable montrent une charge en phosphate de plomb (13.300).

Figure 38

ACPase après 12 semaines de développement. Un nombre important de granules réactifs est retenu dans les cellules musculaires (M) faisant partie de la zone proliférative subendothéliale. L'appareil golgien (g) est coloré également (X 11.800)

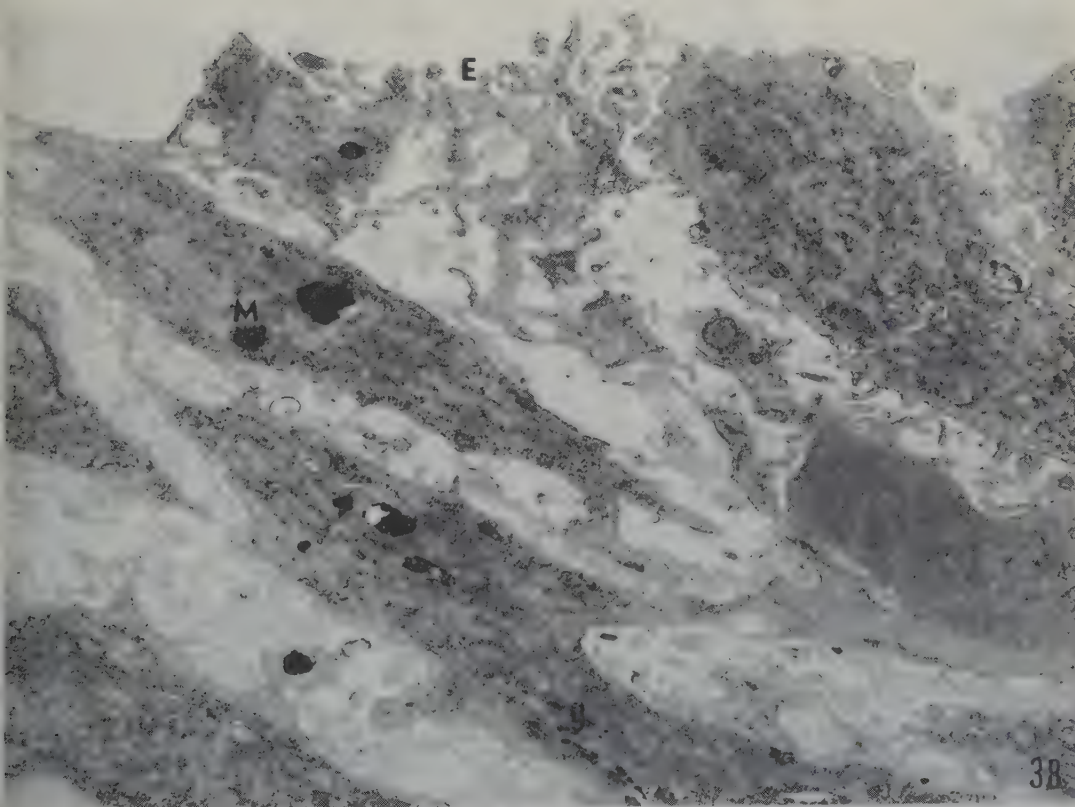


Figure 39

G-6-Pase dans l'épithélium (E) et la média (M) d'une artériole normale.

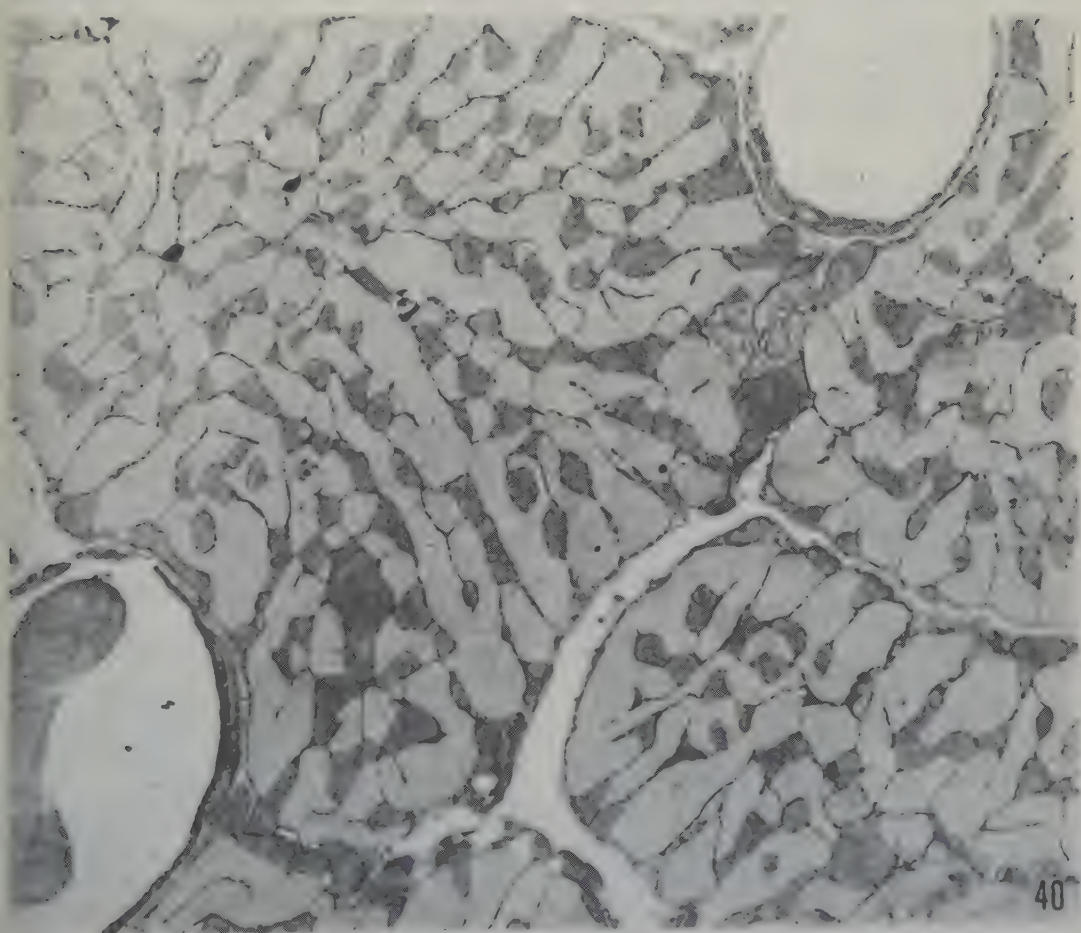
L'enveloppe nucléaire et le réticulum endoplasmique de la cellule endothéliale sont uniformément marqués. Les profils réticulaires courts du muscle lisse sont également chargés en phosphate de plomb (X 15.500).

Figure 40

G-6-Pase. Vue générale de la distribution enzymatique dans la zone myocardique chez l'animal témoin. Le réticulum sarcoplasmique est uniformément réactif (X 7.400).



39



40

Figure 41

G-6-Pase dans deux cellules mésenchymales du tissu conjonctif d'une artère coronaire chez l'animal témoin. Le réticulum endoplasmique très abondant et l'enveloppe nucléaire sont fortement réactifs (X 9.300).

Figure 42

G-6-Pase dans la média d'un segment vasculaire très altéré au stade précoc. Les thrombocytes (T) infiltrés montrent l'activité dans de nombreuses structures tubulo-vésiculaires (X 12.900).

Figure 43

G-6-Pase dans une cellule myocardique dégénérée à proximité d'un vaisseau en développement précoc. La cellule a perdu la majorité de l'activité. Seuls quelques petits fragments du réticulum sarcoplasmique à la périphérie cellulaire montrent encore une faible activité (X 16.000).

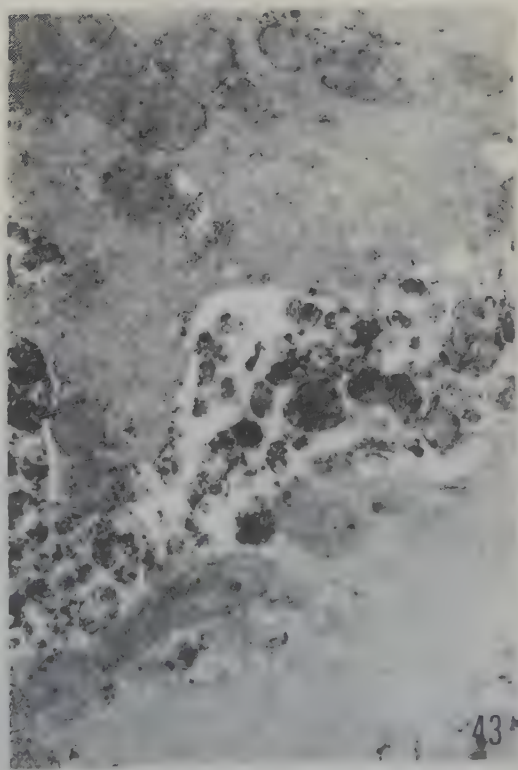
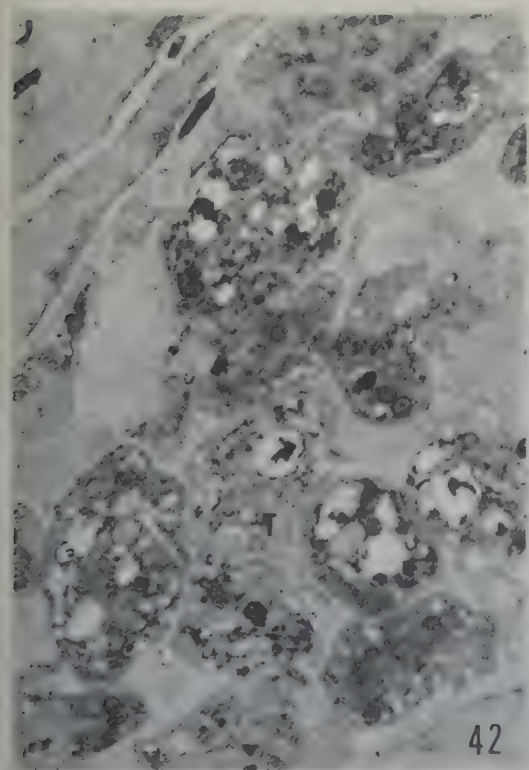
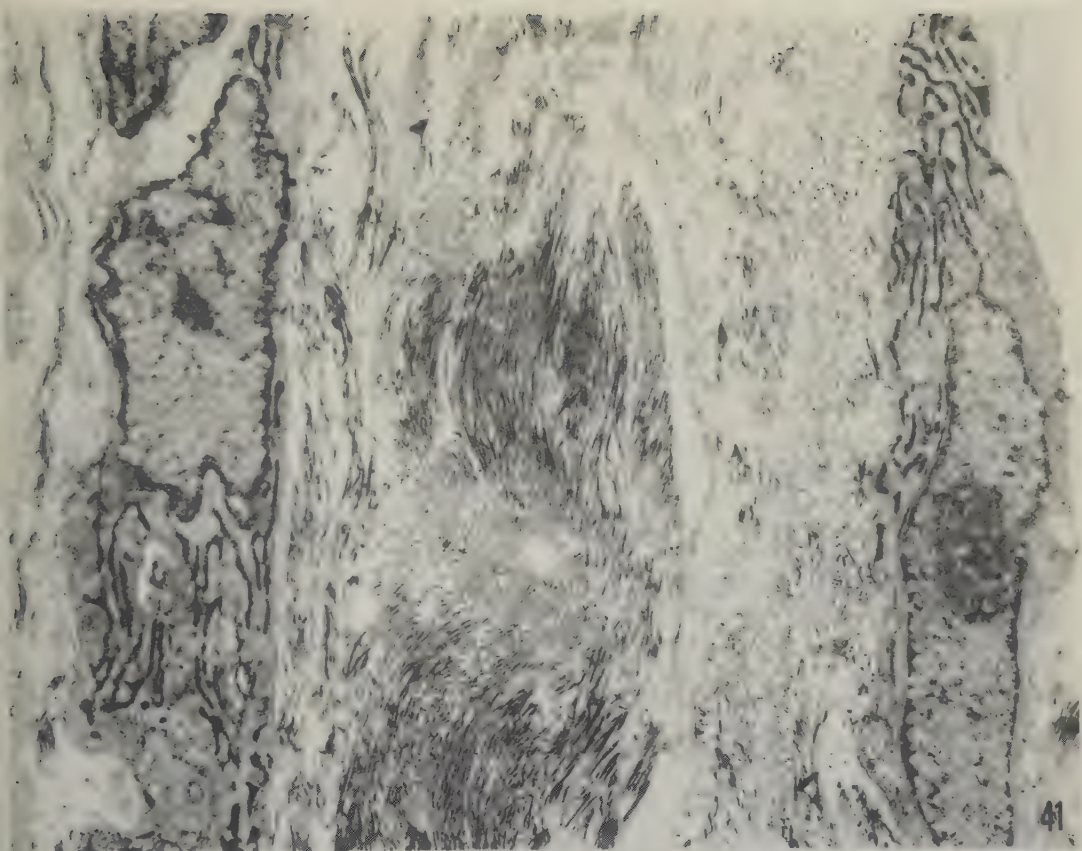


Figure 44

G-6-Pase dans la paroi vasculaire au stade prolifératif (12 semaines). Les cellules endothéliales (E) et les cellules musculaires longitudinales (MI) ainsi qu'un fibroblaste (FI) montrent une réactivité exagérée (X 7.200).

Figure 45

Activité G-6-Pasique dans le myocarde d'un animal 2 ans après développement du système collatéral. Une réaction bien définie est notée au niveau du réticulum sarcoplasmique (rs) entourant les mitochondries et des éléments latéraux des diades (d) et triades (t) (X 15.200).

